

生物工学的手法による
バラの品質改良に関する研究

Studies on Breeding in Rose
by Biotechnological Techniques

鹿児島大学大学院 連合農学研究科
生物資源利用科学専攻 生物機能開発学連合講座

浅野 暁一

目 次

序論	1
第1章 バラのOrganogenic Callusからの不定芽誘導	
第1節 緒言	8
第2節 材料と方法	8
第3節 結果と考察	9
第2章 バラ品種 'Teneke' のOrganogenic Callus からの形質転換体再生	
第1節 緒言	14
第2節 材料と方法	14
第3節 結果と考察	16
第3章 ミニバラ品種 'Shortcake' のImmature Embryogenic Callusからの植物体再生	
第1節 緒言	19
第2節 材料と方法	19
第3節 結果と考察	22
第4章 ミニバラ品種 'Shortcake' のImmature Embryogenic Callusからの形質転換体再生	
第1節 緒言	30
第2節 材料と方法	30
第3節 結果と考察	36
第5章 バラのトゲに関する形態学及び組織化学	
第1節 緒言	51
第2節 材料と方法	52
第3節 結果と考察	54

第6章 バラのトゲに特異的な蛋白質の解

第1節 緒言	70
第2節 材料と方法	70
第3節 結果と考察	72
総括	79
謝辞	84
引用文献	85

略 語

APS, Ammonium peroxodisulfate

BA, 6-Benzyladenine

CBBR, Coomassie brilliant blue R-250

II-D, 2-Dimentional electrophoresis

DW, Distilled water

EDTA, Ethylenediamineteraacetic Acid

GUS, β -glucuronidase

HPT, Hygromycin phosphotransferase

IBA, Indole-3-butyric acid

IEGC Immature embryogenic callus or calli

ME, 2-Mercaptoethanol

MS, Murasige & Skoog's

NAA, 1-naphthalenacetic acid

NHX, Na^+/H^+ -Exchanger

OC, Organogenic callus or calli

PAGE, Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR, polymerase chain reaction

RAPD, Random amplified polymorphic DNA

SAAT, Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation

SDS, Sodiumdodesylsulfate

TEMED, N,N,N',N'-Teramethylethylenediamine

Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethane

X-GLUC, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid

序 論

バラは花のクイーンと言われて人々に愛され、観賞用として世界中で栽培されている。日本に於ける1995年の切りバラの生産本数は年間4.7億本、生産金額で308億円、オランダの生産本数は22.5億本、アメリカは4億本、(大川, 1999) 世界全体としての市場は約2,600億円と推定されている(最相, 2001)。

1888年エジプトのファイyum地方の墓跡の発掘調査が行われた際、7,000年前と推定される棺の中からバラの花環が発見された。もともとエジプトのような暑い地域にはバラは生育していなかったため、発見当時、世界的なバラの分類学者だったベルギーのクレパンに調査を依頼したところ、小アジアからもたらされた一重のピンク色の系統のバラでロサ・ガリカの部類に属するものと同定された(鈴木, 1990)。従って当時すでにこの種のバラの栽培が行われていたと考えられている。

世界で初めてバラの人工交配が行われたのは1804年であり、ナポレオン一世の皇后ジョセフィーヌがマルメゾンの城に世界中から250種以上のバラを集めアンドレー・デュポンに命じてバラの品質改良を行わせたのが始まりとされている(藤岡, 1985)。以来200年間に2万5千種以上の新品種の作出が行われたといわれている。この間多くのローズ・ブリーダー達は青いバラの作出を夢見ながら努力し続けてきたが未だに実現していない。英語の辞書では、青いバラという単語には「あり得ないこと」または「不可能」の意味もあるとするものさえある。所謂ブルーローズと呼ばれている品種の中で、現在最もブルーと評されているのはNHKが2002年11月に、クローズアップ現代「咲け 夢の青いバラ」で放映した品種である。それは、ローズ・ブリーダーの小林森治が、40年以上ブルーローズ同士の人工交配を繰り返し、1994年に発表した『青龍』である。しかしこれも青と言えるものではなく、残念ながら藤色の域を脱していない。この『青龍』にはバラには存在しないとされているデルフィニジンとは異なる新しい青い色素、ロサシアニンが微量含まれていることが発見され、2000年の天然有機物討論会でサントリーと東洋大のチームにより発表された(最相, 2001)。上述のように元来バラには青い色素であるデルフィニジンが存在しないと言われていたのだが、ガーデン・ローズ 'Samba' の若葉には微量ながらデルフィニジンが存在するとの報告(Arisumi, 1968)もある。人工交配だけでは青いバラの作出は不可能とされているが、ゴールに到達できないまでも、まだまだ青に近づけるのではないだろうか。生物工学的技術を駆使する現代のモレキュラー・ブリーダー達の場合にも、最も興味のあるのはやはり青いバラの創出である。1986年にオーストラリアのベンチャー企業であるカルジーンパシフィック(現在フロリジーン)は青いバラの研究を開始した。1987年ドイツのマックス・プランク研究所で*Zea mays* から単離したdihydroquercetin 4-reductaseの遺伝子をdehydrokaempferolを持つ淡いピンク色の花のペチュニアに導入してレン

ガ色に変えることに成功した。これがいわゆるモレキュラー・ブリーディングにより花の色を変えることに世界で最初に成功した例である (Meyer *et al.*, 1987) . サントリーは1990年からフロリジーンと青いバラの協同開発を始めた。その手始めとして青いペチュニアから flavonoid 3',5'-hydroxylase と flavonoid 3'-hydroxylase の遺伝子を単離し、それらの遺伝子を持たない淡いピンク色のペチュニアに導入して赤紫色のペチュニアの作出に成功した (Holton *et al.*, 1993) . フロリジーンは1991年にバラには存在しない青い色素の遺伝子をデルフィニウムから単離している。そこで同社はペチュニアの場合と同様の方法でデルフィニジンの遺伝子をバラに導入する研究開発計画を開始し、1997年には青いバラを1本 80 オーストラリア・ドル程度で市場に出せると予測していた (Lawson, 1991) . しかし、残念ながらこの予測ははずれ現在も未だ実現していない。青い (実際には赤紫) カーネーションの開発の成功で勇気づけられたフロリジーンとサントリーが、おそらくカーネーションと同様の技術をバラにも適用したことは容易に想像できる。しかしバラの場合はカーネーションに比べて遥かに困難なようである。フロリジーンは、すでに色素の50%がデルフィニジンであるバラの作出にも成功しているようであるが、花色は青くなっていない。このバラを従来のいわゆるブルーローズと交配することでブルーローズをより青くできるのではないかと考えられる (最相, 2001) . 青いバラではないが赤いバラに Chalcone synthase の遺伝子を導入する事でピンク色のバラを創出した報告もある (Gutterson, 1995) .

バラには存在しないとされるデルフィニジンの遺伝子を他の植物から単離してバラに導入するという戦略では目的は達成されないようである。次の手段としては花弁細胞の液泡中のpHをアルカリ性に近付ける事で青色に迫る方法である。試験管の中での実験では、ツユ草や朝顔の色素であるアントシアニンは酸性では赤色であり、中性では紫色に、さらにアルカリ性では青くなるとするWillstätterのpH説 (安田, 1993) に対して柴田等は植物体には普通に含まれるカルシウムやマグネシウムがアントシアニンと結合して錯体を作ることによって花弁の色が青くなると発表して (安田, 1993) WillstätterのpH説に真正面から反論した。このことが現在も植物色素についての統一論がなく、いろんな説が提案され未だに論議がなされている状態の発端を作ったとされている (最相, 2001) . ペチュニアのpHを制御する遺伝子は7個 (*ph1-ph7*) もあり (星野, 2002) , しかもクローニングされているのは僅かに1個 (*ph6*) である (Chuck *et al.*, 1993) . これらの7個の遺伝子を単離してバラに導入することは現段階ではほとんど不可能に近く、また導入したとしても

バラの花弁で7個の遺伝子が有効に働くかどうかは全く不明である。

アサガオ (*Ipomoea tricolor*) の蕾は赤紫であるが開花するにつれて次第に青色が増加し、完全に開花すると青色になる。蕾の赤紫色の液泡のpH値は6.6であるが全開した青色の液泡は7.7に上昇する (Yosida, 1995)。これは、生きた細胞の液泡内にマイクロ電極を挿入して液泡のpH値を直接測定した最初の報告である。しかも一度否定されたWillstätterのpH説の復活を思わせるものでもある。青いバラを創出するにはデルフィニジンの遺伝子を導入し更に液泡のpH値を7.0以上に高める必要があることを示唆している。液泡のpH調節には、液胞膜上の Na^+/H^+ -exchanger (NHX)が関与している。NHXは液胞外から Na^+ を取り込み、同時に液胞内から H^+ を放出する。従って、液胞内のpHが変わることになる。アサガオの Mutant の花の色は紫色であるが、その Revertant は青色である。その理由は Mutant の方はNHX遺伝子の上流域に Transposon が存在するためにNHX遺伝子の働きが阻害されて液泡のpH値が上がらず赤紫色に留まっているのに対して、Revertant の方は Transposon の痕跡しかなくNHX遺伝子の働きが阻害されないために、液泡のpH値が高まり花の色も青くなるからである (Fukuda-Tanaka, et al., 2000)。これだけのことが明らかになれば青いバラの創出は時間の問題のようにも思えるが、デルフィニジンとNHXの遺伝子を導入しても青いバラは多分できなかったのではなからうか。何故なら現在も未だ青いバラの創出に成功したとの発表も報告もないからである。前述のNHKの『クローズアップ現代』では、青いバラの研究を行っている日本の2か所の研究所を紹介している。理化学研究所では素粒子加速器を用いてバラの側芽に素粒子を打ち込み、多くの変異体を作出している。ここでは青いバラの研究を積極的に行っているのではなく、変異株のなかに偶然青いバラが出現すれば儲け物と言った程度のことではないかと思われる。次は青森県のグリーンバイオセンターの場合で、2000年に青森県は県のイメージアップに、青森県の青い海をイメージする青いバラの開発プロジェクトを立ち上げた。赤いロベリアに青い色素の遺伝子を組み込んで青いロベリアの花の作出に成功したので、同じ手法でバラのカルスにその遺伝子を導入した。しかしカルスの一部が青くなったが、何故かその後の形質転換体の再生に問題が生じているようで未だ成功していない。

Gillam らはヒトの肝臓から抽出した酵素で培養中の菌が一夜にして青く染ることを偶然見出し (Gillam and Guengerich, 2001)、バイオ企業との共同で青いバラの開発を進めている。その酵素を作る人間の遺伝子をバラに導入して、バラの茎にいくつかの青い点を発生させることには成功したが、青いバラができたとの報告

はまだない。

以上のように青いバラの創出は簡単ではないことだけは確かなようである。単に青い色素の遺伝子を導入しただけでは青いバラは創出できず、またバラはペチュニアやカーネーションとは異なり、遺伝子操作を含む生物工学的手法が開発途上にあることから、青いバラの創出に関して、最相は次のようなアプローチを提案している。（最相，2001）「デルフィニジンの遺伝子を導入して多くのデルフィニジンを蓄積させる。」，「デルフィニジン遺伝子が花卉だけで、しかも蕾から開花する時にタイミングよく発現するように調節する。」，「液泡のpH値を高める遺伝子を導入する。」，「コピグメントを合成したり，デルフィニジンがカルシウムやマグネシウムといった金属元素と結合しやすいバラの品種を選び出す。」，「安定的なバラの遺伝子を操作出来る科学的なシステムを確立する。」。

「美しいバラにはトゲがある。」とか「トゲのないバラは無い。」等の諺のようにほとんどのバラは、針先よりも鋭い危険なトゲを持っている。トゲの働きは不明であるがおそらく崖を這い上がるためのフックの役目や動物や昆虫からの防衛のためにトゲを有していると思われるが、人間にとっては危険で扱いにくいものである。しかしながら原種のバラの中にはトゲがほとんどない、あるいは全くないものもある。例えば *Rosa Banksiae* Aiton 'Alba', *R. Banksiae* Aiton *Lutea* Lindly, *R. glauca* Pourretそして *R. chinensis viridiflora* 等である。バラの育種家には、意図的にまたは偶然に以下のようなトゲの無いバラを作出した者もいる。例えば *R. hybrida* cv. 'Smooth Lady', 'Smooth Romance' そして *Miniature rose R. x hybrida* cv. 'AeCinderella' 等である。

バラのトゲの形態や組織等についてのまとまった報告は全く見当たらず、トゲが本来小枝に起源をもつのか、あるいは葉を起源とするのかといった点についても報告されていない。そこで本研究では、バラのトゲの形態や組織の調査を行うこととした。

バラのトゲ形成にはおそらく何らかの遺伝子が関与しているものと思われる。またトゲはそれが形成される初期の若い時期には柔らかいが、その後硬化してくるので、その硬化に関与する遺伝子も存在する可能性もある。従って、それらの遺伝子を単離し、例えばこれらの遺伝子のアンチセンスDNAをバラに導入すれば、トゲなし、または先端がシャープでないトゲ、あるいは柔らかいトゲをもつバラが創出できるものと考えられる。

本研究の最終目的は、生物工学的手法によるトゲなしバラ、あるいは硬化しないトゲを持つバラの作出であるが、そのためにはカルスからバラの形質転換体を再生させる技術の確立が必須である。しかしながら、植物の形質転換に関する論文は6,000件以上もあるのが、バラに関する文献は少ない (Firoozabady et al., 1994;

Gutterson, 1995; Souq et al., 1996) . その理由は「フリーッシュ・プラント」と言われるペチュニアやタバコ等はカルスの誘導やカルスからの植物体再生も簡単で早く、形質転換植物体も余り困難を伴わず作出できるのに対して、バラの場合はカルスからの植物体再生が困難であるからである。植物体再生が可能な場合でも外来遺伝子を導入すると前述のように植物体再生ができなくなる場合もある。また幸運にも形質転換植物体の再生に成功しても開花までに1年近くを要するという事もある。7,000万年から3,500万年も前の地層からバラの化石が発見されている

(藤岡, 1985) ことからわかるように、バラは木本性の植物であり、草本性のペチュニアやタバコに比べてより原始的な植物であると考えられている。文献の少ないもう一つの理由には特許が関係しているとも思われる。青いバラの開発が成功するまではその過程での中間的な結果の発表は他の研究者を有利にする危険があるため控える傾向がある。

最終目的を達成するために、本研究では、まずバラの高頻度植物体再生系の確立をめざした。次にバラへのレポーター遺伝子であるGUS遺伝子導入法の開発と形質転換体の再生を試みた。さらにバラのトゲを形成あるいは硬化させる遺伝子の発見、単離のために、以下の検討を行った。すなわち、バラのトゲ、葉、茎の皮層、茎の芯（皮層を除去した茎）等の組織から蛋白質を抽出し、SDS-PAGE及び二次元電気泳動（II-D）を行った。幸運にもトゲに特異的でありかつトゲの構造に必須と思われる蛋白質の遺伝子の単離に成功したら、アンチセンス法 (Konkel et al., 1978) や、コサプレッション法 (Napdi et al., 1990) または最近最も有効とされるRNA干渉法 (Fire et al., 1998; 多比良ら, 2003) 等により、その遺伝子の発現をブロックする事で、トゲが無くなったり、または先端が丸いトゲ、あるいは硬化しないトゲ等、トゲがどのように変化するのかを確認したい。

第 1 章

バラの Organogenic Callus からの 不定芽誘導

第1節 緒言

バラのほとんど全ての器官の外植片からの直接的不定芽誘導あるいはカルスを経由した間接的不定芽誘導については、多くの報告がなされている。例えば葉や葉柄切片 (Lloyd *et al.*, 1988; de Wit *et al.*, 1990; Rout *et al.*, 1991; Toyoda *et al.*, 1993; Fukui and Imaida, 1996; Dubois, 1996; Kintzios *et al.*, 1999), 花芯 (Noriega and Sondahl, 1991), 茎 (節間) 切片または茎の柔組織 (Jacobs *et al.*, 1968; Ishioka and Tanimoto, 1990; van der Salm *et al.*, 1996), 茎頂組織からは (Fukui and Imaida, 1996), 根端切片 (Matthew *et al.*, 1991; Mottley *et al.*, 1996; van der Salm *et al.*, 1996; Yokoya *et al.*, 1996), そして未熟種子 (Burger *et al.*, 1990; Kunitake *et al.*, 1993; Visessuwan *et al.*, 1997) 等である。本研究では主にFukuiとImaida(1996)の論文を参考として、不定芽誘導の確率が高いと考えられる24種のホルモン設定区を選び、5種類のバラを実験材料として、それらの若葉の外植片からのカルス誘導及び不定芽誘導と、さらに植物体再生についての検討を行った。

第2節 材料と方法

材料には京成バラ園より購入した次の5種類のバラを用いた。3種類のHybrid Tea Rose *Rosa hybrida* cv. 'Laura', 'Mächenkönigin', 'Golden Heart' と, Miniature rose *R. x hybrida* 'Orange Rosamini', それにFloribanda Rose *R. hybrida* cv. 'Teneke' である。

若葉を切り取り、少量のトライトン X-100を含む次亜塩素酸ナトリウム溶液中 (有効塩素濃度1.5%) で20分間攪拌しつつ滅菌し、滅菌蒸留水で2回水洗した後約5mm角の外植片を切り出した。MSの無機塩類とビタミン類 (Murashige and Skoog, 1962), sucrose 30g/l, Gelrite (SIGMA) 2.5 g/l (pH 5.7)を含む培地を基本培地 (以下 MS 培地と称す)とし、これにBA (0, 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01 mg/l) 及びNAA (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/l) を組み合わせて添加した合計24のホルモン区を設定して不定芽誘導の実験を行った。15枚の外植片を100 ml の上記培地を入れた 75 mmφ, 400 ml のガラス培養瓶中の培地上に置床し、暗期下、25±1 °Cで2～3週間毎に継代し3ヶ月間培養後、形成された不定芽の数を測定した。'Laura' と 'Teneke' については実験を同一条件で3

回繰り返し行った。その他は1回の実験結果である。

一部の不定芽は植物再生を行うために、BA 1mg/lを含む100mlのMS再生培地の入った上記培養瓶に移し、16時間明期/8時間暗期下、 25 ± 1 °Cで2～3週間毎に継代し2～3ヶ月間培養した。4～5 cm程度に成長したシュートはIBA 0.25mg/lを含む1/2MS発根培地（Gelriteは0.25%）100mlが入った上記培養瓶に移植し、16時間明期/8時間暗期下、 25 ± 1 °Cで1～2ヶ月間培養した。次に上部を切り取った1.5リットルの透明のペットボトルに充分水を浸したバーミキュライトを入れ、そこへ発根が認められた小植物体を移植して、ペットボトルの上部をサランラップと輪ゴムで密閉して日の当たる場所に放置した。2日毎に1～2個の割合で直径1cm程度の穴をサランラップにあけながら、1～2週間かけて馴化した。その後温室の土壤に移植して育成した。

第3節 結果と考察

1. 不定芽形成

5種類のバラの全ての外植片からカルスが形成され、一部のカルスから不定芽が誘導された。これらのカルスは全て一体化しており、固く容易にほぐれることなく、誘導された不定芽やシュートも同様に一体化しており、個々に分離するのが困難であったことから、これらのカルスをOrganogenic Callus（以後OCと略記する。）と判断した。不定芽形成率はFig. 1に示した。‘Laura’と‘Teneke’については同一条件で3回実験を繰り返したがいずれも再現性が悪く、‘Laura’ではFig. 1. 1Aに示したように、第1回目の実験では全てのホルモン設定区でカルスの誘導のみであり、不定芽の形成は認められなかった。第2回目（緑色）と第3回目（橙色）の実験結果に示したように、同じホルモン設定区ではなく、異なる設定区で不定芽の形成が認められた。Fig. 1. 1Bの‘Märchenkönigin’、Fig. 1. 1Cの‘Golden Heart’、Fig. 1. 1Dの‘Orange Rosamini’は1回の実験結果を示したものであるが、それぞれ異なるホルモン設定区で不定芽の形成が認められた。Fig. 1. 1Eに示した‘Teneke’の不定芽形成率は同一条件で3回繰り返した実験結果の平均値を示したものである。24区中21区のホルモン設定区で不定芽の形成が認められた。5種類のバラの中で最も不定芽形成が良好であったのは‘Teneke’であった。しかしいずれも不定芽形成率は低く13%を超えるホルモン実験区は見当たらなかった。

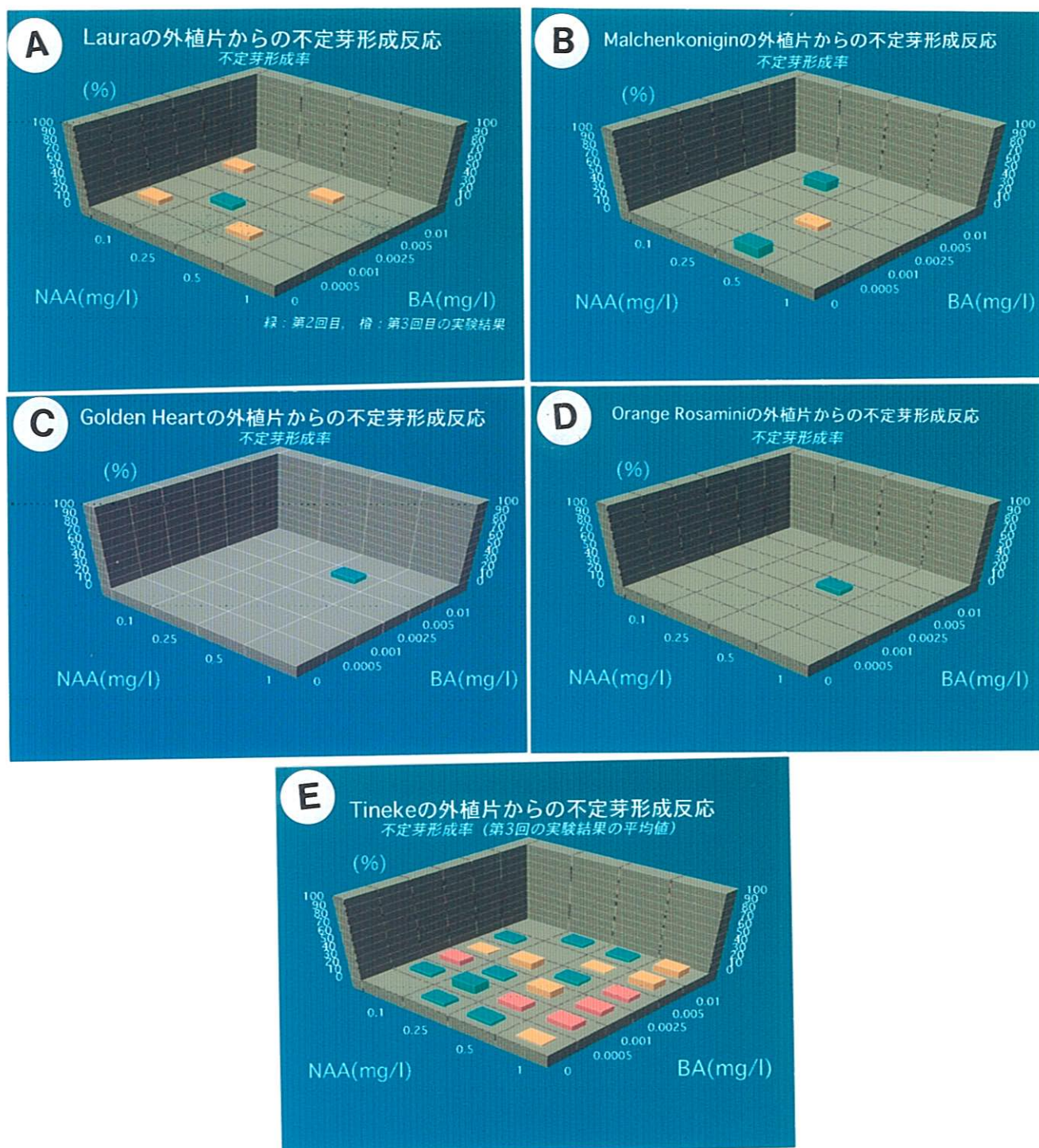


Fig. 1. 1 5品種のバラの若葉外植片から誘導されたカルスの24区のホルモン設定区に於ける不定芽形成率

‘Laura’ (A), ‘Märchenkönigin’ (B), ‘Golden Heart’ (C),
‘Orange Rosamini’ (D), ‘Teneke’ (E)

不定芽誘導条件; 暗黒下, 25 ± 1 °Cで2~3週間毎に継代し3ヶ月間培養

2. 植物体再生

上記5種類全てのバラの不定芽から50%~75%の確率で植物体を再生することができた。その一例として‘Laura’の植物体再生について述べる。Fig. 1. 2Aに

‘Laura’の不定芽を示したが、この不定芽を植物ホルモンとして1.0mg/l BAを含む再生MS固形培地上に移植し、16時間明期/8時間暗期の長日条件下で2~3週間毎に継代した。Fig. 1. 2Bに再生培地に移植後1.5ヶ月を経過したシュートを示した。長さ約4~5 cmにシュートが成長したものを、0.25mg/l IBAを含む発根誘導のための1/2MS発根培地（MS無機塩類濃度1/2, sucrose 15g/l, Gelrite 0.25%）（Hasegawa, 1980）上に移植し、1~2ヶ月間、 25 ± 1 °Cで上記長日条件下で培養し、発根した小植物体を逐次馴化した後土壌に移植した。Fig. 1. 2Cには小植物体を土壌に移植してから約8ヶ月後の開花した‘Laura’を示した。Fig. 1. 2Dは実験材料に用いたオリジナルの‘Laura’である。花の色と形、大きさ、葉の形と大きさ、さらにトゲの形や数等を詳細に観察したが明らかにオリジナルのものと異なるような変異は認められなかった。

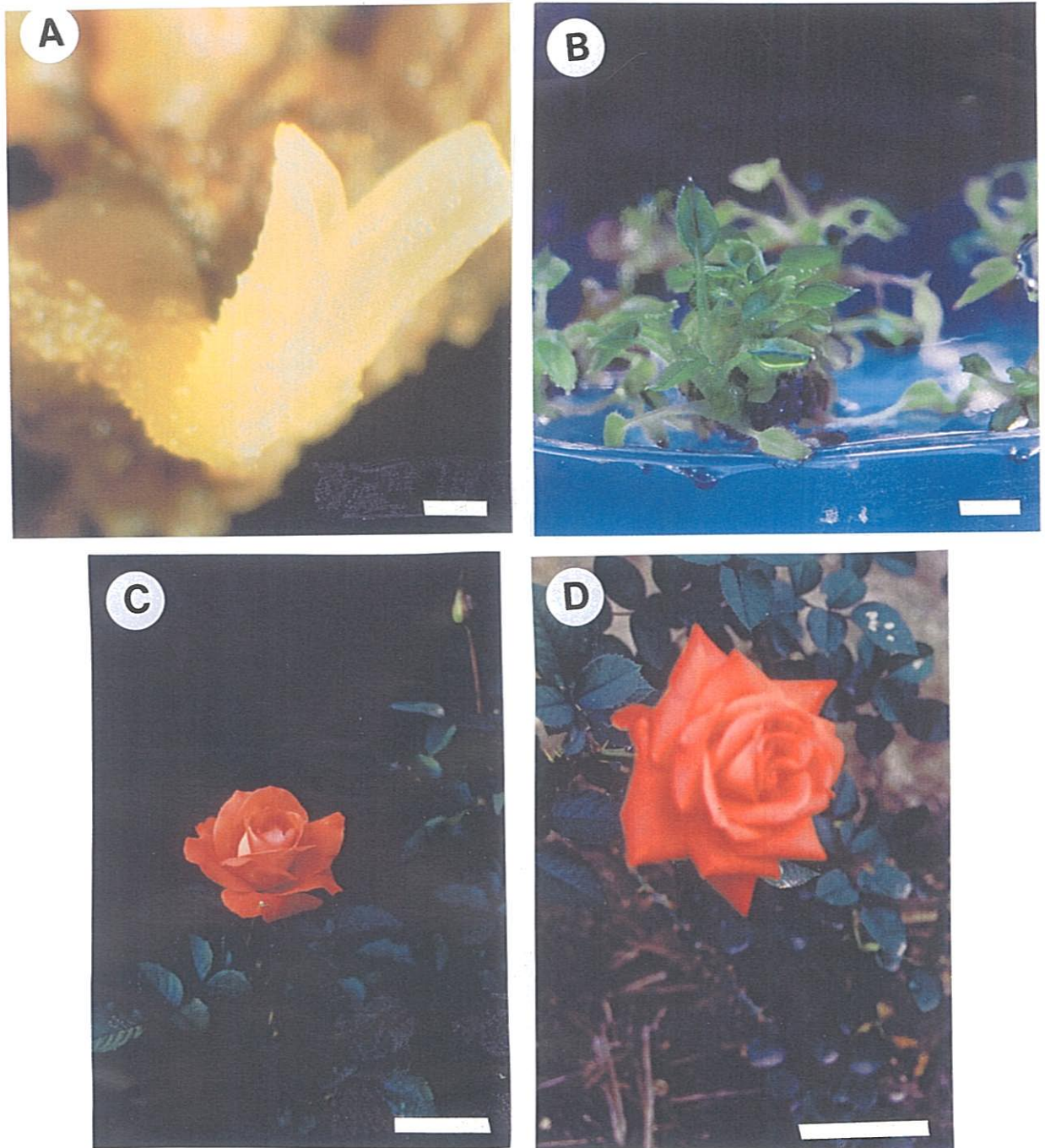


Fig. 1.2 'Laura' の不定芽からの植物体再生

0.001 mg/l BAと0.25 mg/l NAAを含むMS培地で3ヶ月培養して誘導した不定芽 (A) (bar = 1mm), 不定芽を再生培地 (BA1.0 mg/l を含むMS培地) に移植後1.5ヶ月を経過したシュート (B) (bar = 1cm), 小植物体の馴化処理を終えて土壌に移植してから8ヶ月を経過した再生植物体 (C) (bar = 5cm), 本実験に使用したオリジナルの 'Laura' (D) (bar = 5cm)

第 2 章

バラ品種 ‘Teneke’ のOrganogenic Callus からの形質転換体再生

第1節 緒言

第1章で実験材料に用いた5種類のバラのうち最も不定芽発生率の高かった‘Teneke’のOCからの形質転換体の再生を試みることにした。バラの品質を生物工学的手法を用いて改良するには、それに必要な遺伝子を導入する必要がある。

本実験では*Agrobacterium tumefaciens* 仲介法を用いた。次に導入された遺伝子がバラのゲノムに取り込まれて発現しなければ意味がない。通常導入された外来遺伝子が正常に発現したかどうかを確認するための予備実験には、レポーター遺伝子として β -glucuronidase (GUS) 遺伝子が用いられている。GUS遺伝子の一過性発現を判定する簡便法としてX-GLUCによるGUS検定が行われている。GUS遺伝子が発現しGUS蛋白質が作用すればX-GLUCによって青い色素のインデゴチンが生じるので容易に確認できるからである。

第2節 材料と方法

1. 実験材料

Floribanda Rose *R. hybrida* cv. ‘Teneke’ を用い、第1章に示した方法で誘導したOCをMS 培地に 0.1mg/l BAと 0.5 mg/l NAAを添加したカルス増殖培地で増殖して使用した。

2. *Agrobacterium tumefaciens* 仲介によるGUS遺伝子の‘Teneke’のOCへの導入

2. 1. *Agrobacterium* 菌との共存培養

Fig. 2. 1に示したT-DNAを持つ*A. tumefaciens* LBA4404/ pBI121を100 mg/lのカナマイシン（明治製薬）を添加した40 mlのYEB液体培地（0.5% beaf extract, 0.1% yeast extract, 0.5 % pepton, 0.5 % sucrose, 0.5 % 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2)の入った100ml フラスコで30℃で120rpmで2 昼夜震盪培養後、5,000rpmで5 分間遠心して菌を回収した。YEB液体培地で回収した菌を2 回洗浄して再び5,000rpmで5 分間遠心して菌を回収した。YEB培地に菌を懸濁させてVortexし、スペクトロメータ(U 2000, 日立)で懸濁液のOD₅₉₅値が0.5と

なるように菌密度を調整した。その菌溶液100mlを300mlのフラスコへ移し、さらに3～5mmにメスで細かく切断した‘Teneke’のOC80片を投入し、15分間菌と共存培養（120rpm）を行った。OCを濾紙上に取り出して余分な菌と培養液を除去してから、培地（MS 培地, 0.1 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA）に敷いた滅菌濾紙上に移植して暗黒下、25℃で2日間培養した。

培地に直接触れたカルスや2日間以上培養したカルスは菌の増殖が過剰となり後の除菌が非常に困難であった。500 mg/lのクラフォラン（アベンチスファマー）を含む水溶液100 mlを入れた300 ml フラスコにカルスを投入し120rpmで2時間震盪除菌した後、菌の死滅により白濁した溶液を捨て滅菌水で2回洗浄した。この処理を2回くり返した後、カルス選抜培地（MS 培地, 0.1 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 500 mg/l クラフォラン, 300 mg/l カナマイシン）上に移し暗黒下、25℃で2～3週間毎に継代しながら2ヶ月間培養を行った。選抜のためのカナマイシンの最低必要濃度を決める予備実験では、カナマイシン濃度は200 mg/l で充分であったが、さらに確実にするために300 mg/l とした。



Fig. 2. 1 *Agrobacterium* LBA4404/ pBI121のT-DNAの構造

RB : right border, NP: nopaline synthase promoter, NPT II : neomycin phosphotransferase II gene, NT: nopaline synthase terminator, 35S : CAMV 35S promoter, GUS : β -glucuronidase gene, LB : left border.

2. 2. GUS検定方法 (Jefferson, 1987; Jefferson et al., 1987)

カナマイシン選抜培地で2か月間80片のOCを培養した結果、生存した2片のOCをメスでそれぞれ半切して4片とし、不定芽誘導に使用するために2片は残し、残り2片を以下の手順でGUS検定に用いた。

- A. サンプルを固定液(エタノール1 : 酢酸3)に浸漬し、真空ポンプで10分間脱気後常温で30分間放置
- B. 50mMリン酸バッファー(pH 7.0)で2回洗浄
- C. GUS検定液 (10 mM EDTA- Na_2 , 0.1% Triton X-100, 0.1% Na_2PO_4 ,

0.5 M $K_3Fe(CN)_6$, 250 $\mu g/ml$ X-GLUC)にOCを浸漬し, 真空ポンプで10分間脱気

- D. 37℃で一昼夜震盪反応
- E. GUS検定液を除去しエタノールを加えて反応を停止
- F. 必要があれば次亜塩素ナトリウムで脱色
- G. 顕微鏡で観察記録

2. 3. 形質転換不定芽誘導方法

上述した残りの2片を不定芽誘導に使用した。形質転換したと思われる2片のOCを最も不定芽発生率が高かったホルモン設定区の培地 (MS 培地, 0.001 mg/l BA, 0.25 mg/l NAA, 500 mg/l クラフォラン, 300 mg/l カナマイシン) 上に移植して暗黒下, 25℃で2～3週間ごとに継代培養を行った。大きく成長したOCは適宜メスで分割しながら約1年間不定芽誘導を行った。

第3節 結果と考察

2ヶ月間のカナマイシン選抜培養で生き残ったOCは80片中僅かに2片 (2.5%) であった。選抜で生き残った2片のOCをそれぞれメスで半分に切断して, それぞれ2片のみGUS検定を行った。検定の結果はFig. 2. 2に示したように, 半切したOC2片とも青色に発色しGUS(+)であった。残りの形質転換したと思われる半切OC2片を選抜不定芽誘導培地 (MS 培地, 0.001 mg/l BA, 0.25 mg/l NAA, 500 mg/l クラフォラン, 300 mg/l カナマイシン) 上に移植して暗黒下, 25℃で2～3週間ごとに継代培養し, 約1年間不定芽誘導を行ったがOCが増殖するのみであり, 不定芽形成の徴候は全く認められなかった。

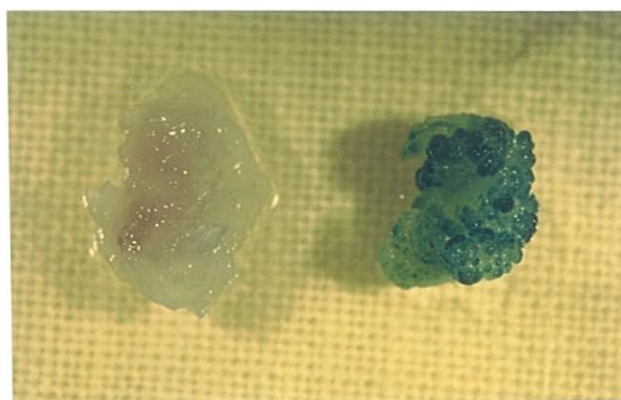


Fig. 2.2 ‘Teneke’ の形質転換OCのGUS検定結果
非形質転換OC（左），GUS遺伝子の一過的発現で青色に発色した
形質転換OC（右）

そこでさらに選抜再生培地（MS 培地，0，0.5，1，2，4 mg/l BA，500 mg/l クラフォラン，300 mg/l カナマイシン）にOCを移植し，今度は16時間明期/8時間暗期下で，25℃で2～3週間ごとに継代培養し，6ヶ月間培養を行った．しかしOCはやはり増殖するのみで，不定芽形成の徴候は全く認められなかった．この原因は明らかでないが，元来‘Teneke’のOCの不定芽発生率が低い(13%)こと，さらに培地中に添加したクラフォランやカナマイシン等の抗生物質が悪影響を及ぼしていると思われること，あるいはGUS遺伝子を含むT-DNAがバラのゲノムDNAに挿入されることになるが，その挿入によって本来の遺伝子発現が阻害された部位が不定芽形成にも抑制的な影響を及ぼしている可能性等が考えられる．すでに序論でも述べたように，青森県のグリーン・バイオセンターにおいても，青いバラを作出するためにバラのカルスにデルフィニジンの遺伝子を導入したところ，カルスの植物再生能力が失われてしまったという事実がある．このような事は技術的に未完成の現段階では充分起こりうることでありと思われる．従って‘Teneke’OCからの形質転換体再生を断念して新たに植物体再生能力の遥かに高い‘Shortcake’のIEGCで実験を進めることにした．

第3章

ミニバラ品種 ‘Shortcake’ のImmature Embryogenic Callus からの植物体再生

第1節 緒言

バラにおいては、種々の器官組織切片から直接的またはカルス経由の間接的な植物体再生が報告されている。例えば葉または葉柄切片 (Lloyd *et al.*, 1988; de Wit *et al.*, 1990; Rout *et al.*, 1991; Toyoda *et al.*, 1993; Fukui and Imaida, 1996; Dubois, 1996; Kintzios *et al.*, 1999), 花芯 (Noriega and Sondahl, 1991), 茎または柔組織切片 (Jacobs *et al.*, 1968; Ishioka and Tanimoto, 1990; Rout *et al.*, 1991; van der Salm *et al.*, 1996), 茎頂組織 (Fukui and Imaida, 1996), 根端組織 (Matthew *et al.*, 1991; Mottley *et al.*, 1996; van der Salm *et al.*, 1996; Yokoya *et al.*, 1996) そして未熟種子 (Burger *et al.*, 1990; Kunitake *et al.*, 1993; Visessuwan *et al.*, 1997) 等である。これらの報告に使用されたバラは主として野生種または *R. hybrida* である。本研究では Miniature rose ‘Shortcake’ を用いた。ミニバラは草丈が野生種や *R. hybrida* に比較して低いので *in vitro* での成長が迅速であり、また植物体再生能力も高い事が期待されるからである。

バラの不定器官形成 (Burger *et al.*, 1990), 不定胚形成 (Kunitake *et al.*, 1993) については既に報告されている。本研究では、ミニバラ ‘Shortcake’ の未熟種子由来の IEGC から再生した植物体とオリジナル植物体について、染色体分析及び RAPD 分析を行って比較することとした (Asano and Tanimoto, 2002)。

第2節 材料と方法

1. 材料

3年以上の間、温室で栽培した Miniature rose *R. x hybrida* cv ‘Shortcake’ (京成バラ園) を用いた。

2. IEGCの誘導及び増殖方法

自家受粉後 3～4 週間が経過した約 10×15 mm の大きさの果実を採取し、種子 (3～5 mm) を取り出し、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 1.5%) で

5 分間滅菌した後滅菌水で 2 回洗浄した。メスで 20 個の種子を縦方向に半切し、ホルモン無添加の MS 培地上に切断面を下にして、25℃で 16 時間明期/8 時間暗期の長日条件下で継代培養を行わずに 3 ヶ月間培養し、IEGC の誘導を行った。この実験を 3 回くり返した。

誘導された IEGC は 0.25 mg/l BA と 0.5 mg/l NAA を含む MS 培地に移植し、25℃で暗黒下、2 ～ 3 週間で継代しながら増殖させた。大きく成長した IEGC は 2 ～ 3 mm の大きさに分割して増殖させた。

3. 植物体再生方法

植物体再生に及ぼすサイトカイニンの効果を調べるために、0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l BA を含む MS 培地にカルスを移植し、25℃で 16 時間明期/8 時間暗期で 2 ～ 3 週間の周期で継代しながら 3 ヶ月間培養して植物体再生を行った。IEGC 上に発生した数多くのシュートを 0.25 mg/l IBA を含む 1/2 MS 発根培地 (1/2 濃度の MS 無機塩類とビタミン類, sucrose 15 g/l, 2.5 g/l Gelrite) (Hasegawa, 1980) に移植し 25℃で 16 時間明期/8 時間暗期で 1 ～ 2 ヶ月間培養し発根を促した。次に上部を切り取った 1.5 リットルの透明のペットボトルに充分水を浸したパーミキュライトを入れ、そこへ発根が認められた小植物体を移植して、ペットボトルの上部をサランラップと輪ゴムで密閉して日の当たる場所に放置した。2 日毎に 1 ～ 2 個の割合で直径 1 cm 程度の穴をサランラップにあけながら、1 ～ 2 週間かけて馴化した。その後温室の土壌に移植して育成した。

4. 染色体の観察

未展開の幼葉 (～ 3 mm) を 2 mM hydroxyquinol 溶液中に浸し、20℃暗黒下で 4 時間処理後、固定液 (酢酸 : エタノール = 1:3) 中で室温で 24 時間処理して組織の固定と脱色を行った。切片を蒸留水で 2 度洗浄し、スライドグラス上で出来るだけ細かく剃刀の刃で切りきざみ、0.3% Cellulase RS (YAKULT HONSHA Co., LTD.), 0.2% Pectolyase Y-23 (Kikkoman Corp.), 75 mM KCl と 7.5 mM EDTA の溶液 100 μ l の入った 1.5 ml マイクロチューブに入れ、37℃で 3 時間酵素処理を行った。75 mM KCl と 7.5 mM EDTA の緩衝液で洗浄し、4℃で 700g で 5 分間遠心し、沈殿を固定液で 2 回洗浄し、再び 100 μ l の固定液に懸濁させて Vortex で攪拌した。沈殿を清浄なスライドグラスに均一に広げるために 10 μ l の沈

沈殿溶液を15~20 cmの高さからスライドガラス表面上に滴下した。次にスライドガラスをデシケーターに入れ一昼夜乾燥させた。そのスライドガラスを2 % (v/v) Giemsa's Solution (MERCK) (Darling and Cour, 1960; Ma *et al.*, 1996) と 1/30 mM Na-phosphate 緩衝液に常温で1時間浸漬して染色した。その後、蒸留水に10分間浸漬し、最後に再びデシケーターに入れて乾燥保管した。染色体サンプル上にキシロールを1滴滴下し、カバーガラスを載せ光学顕微鏡で観察記録した(倍率1,000倍)。

5. 染色体数の比較

未展開の幼葉1枚(約5×5 mm)をプラスチック板上に乗せ、その上に核抽出液 (Partec, high resolution DNA kit type-P) 数滴を幼葉上に滴下し剃刀の刃で幼葉をできるだけ細かく切り刻み、室温で3分間反応させた。フィルター(30 μm)で濾過した液に少量の核染色液 4'-6-diamino-2-phenylindole dye solution (Partec, high resolution DNA kit type-P) を加えて室温で3分間反応させた。ploidy analyzer (Partec, PA型, Germany)を用いて溶液に紫外線を照射することで、核から放射される蛍光の強度のピーク位置を測定し、染色体数を比較した。

6. RAPD

オリジナル植物体と再生植物体の幼葉(約0.5 g新鮮重)を液体窒素で凍結して乳鉢と乳棒を用いて充分細かく粉砕した。DNA抽出純化キット (NIPPON GENE, ISOPLANT II)を用いて、ゲノムDNAをサンプルから抽出した。100 ng / μl DNA (オリジナル植物体及び再生植物体由来) 0.5 μl, 10× buffer (250 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl, 1 % Triton X-100) 3.2 μl, 1.2 mM dNTPs 1.6 μl, 10 pMランダムプライマー (OPERON TECHNOLOGY, OPA01~20 及び OPD01~20) 1 μl, 5,000 u/ml γTaq DNA polymerase (TOYOBO) 0.1 μl と蒸留水 13.6 μl から構成した混合液計20 μl をPCR用の200 μl マイクロチューブに入れて静かに攪拌した。最後に1滴のミネラルオイル (SIGMA) を乗せた。PCR 増幅器 (TECHNE, Techgene) を用いて94 °C×0.5 分, [94 °C×0.5 分, 40 °C×2 分, 72 °C×3分] ×40 サイクル, 72 °C×8 分の条件下(Torres, 1993) でDNAを増幅した。全部で80種のPCR産物を, 0.8 mg/l ethidium bromideを含むTBA バッファー (

40 mM Tris , 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA), 0.8 % アガロースゲル中で 100 ボルト, 80 分間電気泳動を行った. UV 光下で アガロースゲル上の多形DNA バンドを観察し, CCD-カメラ(FAS-III, TOYOBO)で記録した.

第3節 結果と考察

IEGCの発生頻度はTable 3. 1に示すように平均で3.3 %であった. この数値はすでに報告されている結果 (5%, Kunitake *et al.*, 1993) と同程度のものではあった. IEGCの特徴は, 球状または葉状の構造で, ほぐれ易いのでFig. 3. 1に示すように鱈子状の構造を持つOCと目視で容易に区別する事ができた. IEGCの成長速度はOCの2倍以上であった.

Table 3. 1. ホルモン無添加の MS培地上で未熟種子を 3 ヶ月培養した場合のIEGCの誘導頻度

実験	未熟種子数	IEGC数	非-IEGC数
1 st	20	1 (5 %)	0
2 nd.	20	1 (5 %)	1 (5 %)
3 rd	20	0	1 (5%)
Total	60	2 (3.3%)	2 (3.3%)

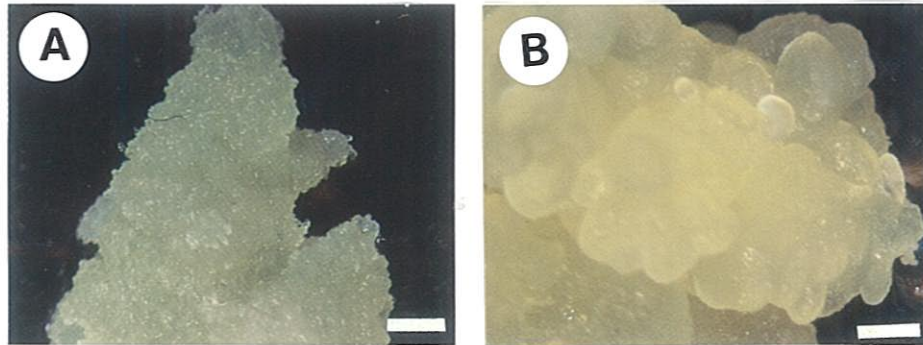


Fig. 3. 1 ‘Shortcake’ のカルス
葉由来の OC (A) と 未熟種子由来のIEGC (B) (bar = 1 mm)



Fig. 3. 2 ‘Shortcake’ IEGC上に再生したシュート
IEGCを1 mg/l のBA を含むMS 培地上で3ヶ月間, 25 °Cで, 16時間
明期/8時間 暗期で 2~3 週間毎継代を行って再生したシュート
(bar = 1 cm)

植物体再生に対してBAの及ぼす効果をTable 3. 2に示した。0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l BAを含むMS再生培地上にIEGCを移植して3ヶ月後に発生したシュート数を記録した。最適なBA濃度は1.0 mg/lであった。

Table 3. 2. 未熟種子由来のIEGCをBAを含むMS培地に移植し3ヶ月培養した場合のシュート再生に及ぼすBAの効果

BA (mg/l)	IEGC数	再生シュート数	再生シュート数 / IEGC ^{*1}
0	21	0	0
0.5	21	23	1.1
1	21	161	7.7
2	21	36	1.7
4	21	5	0.2

^{*1} 新鮮重量： 約3g/個

Fig. 3. 2はIEGC上に発生した多くのシュートである。シュートを前述と同一の1/2 MS発根培地に移植後1ヶ月間で80 %のシュートに発根が認められた。小植物体は馴化後温室の土壤に移植し、その約70 %が順調に成長した。再生した植物体には形態上の変異が見られた。花の大きさは再生植物体 (Fig. 3. 3A, 右)の方がオリジナル植物体 (Fig. 3A, 左)より若干大きかったが、花卉の数はオリジナル植物体より少なく、花卉の数の平均値はそれぞれ17.9と25.6であった。再生植物体の花卉の表側の色はFig. 3. 3B, 上, 右に示すようにオリジナル植物体 (Fig. 3. 3B, 上, 左)と同じく赤色であったが、再生植物体の花卉の裏側 (Fig. 3. 3B, 上, 右)はオリジナル植物体 (Fig. 3. 3B, 下, 左)での白色がほとんど消えていたので花色は赤というよりも透明なピンクがかった赤色であった。このように花卉の赤と白の色から‘Shortcake’と命名されたのではないと思われる。花卉の大きさは再生植物体の方がやや大きかったが形状はほとんど同じであった。再生植物体の単葉の形状 (Fig. 3. 3C, 右)は円形に近かったが、オリジナル植物体の単葉 (Fig. 3. 3C, 左)はむしろ楕円形に近く異っていた。単葉の長さ／幅の比の平均値はそれぞれ1.22と1.75あった。また再生植物体のトゲの数も減少しており、茎の長さ1 cm

当たりのトゲの数はそれぞれ1.22 と 1.75 であった。更にトゲの形状も細くかつ小さくなっていた。

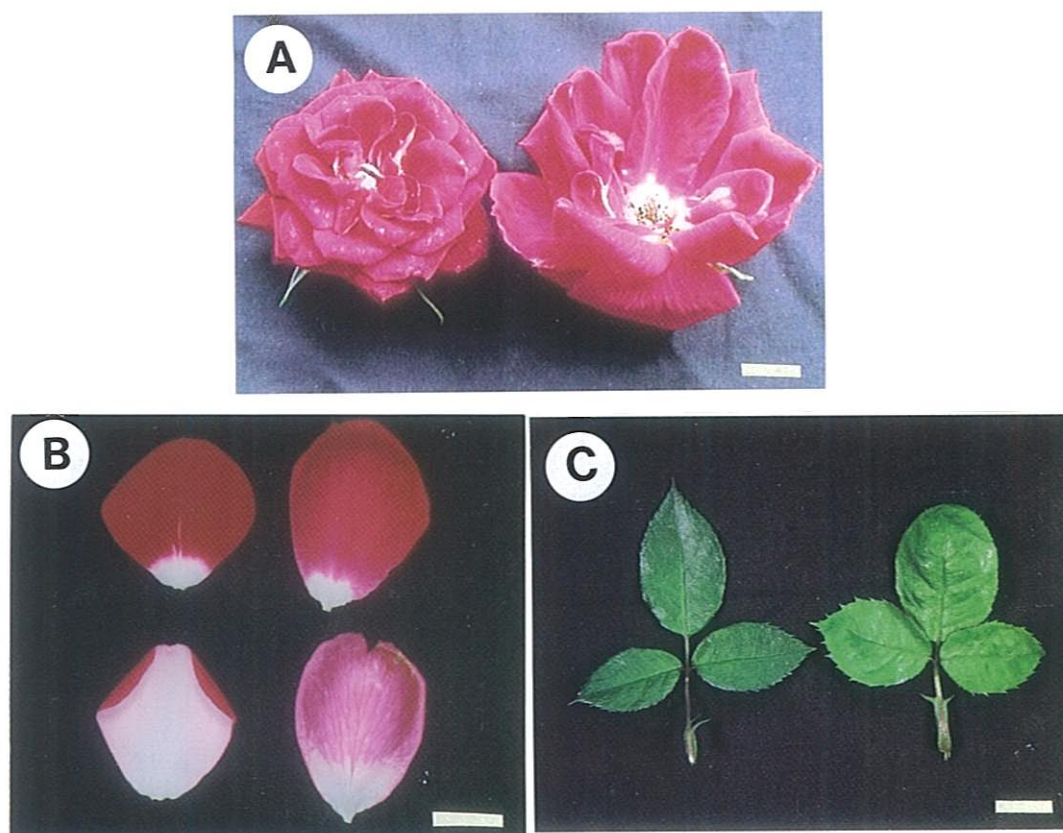


Fig. 3.3 ‘Shortcake’ の再生植物体に現れた変異
花 (A), 花弁の表面 (B, 上) と 裏面 (B, 下), 3枚葉 (C),
オリジナル植物体 (左), 再生植物体 (右) (bar = 1 cm)

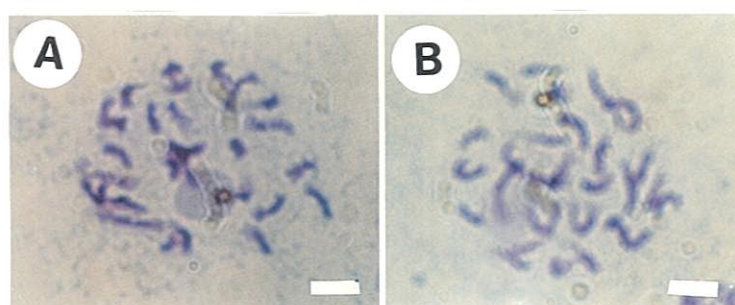


Fig. 3.4 ‘Shortcake’ の染色体
オリジナル植物体の染色体 (左) と 再生植物体の染色体 (右) (bar = 1 cm)
(両植物体とも 4 倍体である。 $2n = 4X = 28$). (bar = 2 μ m)

Table 3. 3に再生植物体の形態に現れた変異の一覧表を示した。これら測定値統計処理及び有意判定にはStudent's test (Brandt, 1970)を用いた。

Table 3. 3 再生植物体の形態に発生した変異

植物体	花の直径 (cm)	花弁数 (枚)	単葉形状比 (長さ/巾)	トゲ数/cm (茎長)
再生植物体	5.4 ± 0.69^a	17.9 ± 2.7^b	1.22 ± 0.09^c	0.22 ± 0.09^d
オリジナル植物体	4.6 ± 0.57^a	25.6 ± 2.6^b	1.75 ± 0.2^c	1.26 ± 0.53^d

a: α (有意のレベル) = 0.25 b,c,d: α = 0.01 測定数 = 20

バラの染色体数についてはすでにいくつかの報告がある。例えば *R. chinensis* Jacq. は2倍体(Saitoh, 1969), *R. damascena* は4倍体(Tabaezadeh and Khosh-khui, 1981), *R. wichuraiana* Creep \times *R. roxburghii* Thratt. は2倍体, *R. hybrida* 'Sunflare' と 'Angel Face' は4倍体 (Ma et al., 1996), *R. hybrida* は4倍体, そして *R. rugosa* は2倍体(Souq et al., 1996) 等である。

再生植物体とオリジナル植物体の染色体の写真をそれぞれ Fig. 3. 4 に示した。再生植物体とオリジナル植物体の染色体数はいずれも $2n = 28$ (少なくとも30個の細胞について調査した)であった。従って双方とも4倍体であることが判明した。

このことは、2倍体であるとすでに報告されている原種のバラ *R. chinensis* Jacq. と再生植物体及びオリジナル植物体とをそれぞれploidy analyzer PAで比較することでも明らかになった。

その結果をTable 3. 4に示した。再生植物体とオリジナル植物体のploidy index は2倍体であれば1.0, 4倍体であれば2.0となる事が期待される。しかし測定結果は2.0ではなく2.0に近い値を示した。2.0より小さく少しずれている原因は明らかではないが、それぞれの植物体の核から放出される蛍光の強度にわずかな違いがあるためか、またはheteroploid (Saitoh, 1969) の存在の影響かもしれないが、ploidy analyzer PAはheteroploidの分析ができるほどの分解能力を持っていない。

従って 再生植物体の形態に現れた変異は染色体数とは無関係であると思われる。

Table 3. 4 Ploidy Analyzer PA (Partec, PA型, Germany)
による再生植物体とオリジナル植物体の染色体数の比較測定結果

植物体	Index (平均値±標準偏差)	
再生植物体	R1	1.925±0.011
	R2	1.927±0.019
	R3	1.883±0.022
オリジナル植物体		1.898±0.019
<i>R. chinensis</i> Jacq		
(2倍体,比較標準)		1.000

測定数 = 各10固体, *R. chinensis* Jacq (京阪園芸, 大阪, 日本)

再生植物体 とオリジナル植物体のRAPD分析の結果をFig. 3. 5に示した。40種類のランダムプライマー (OPA-01~20, OPD-01~20) のうちわずかに4種類のランダムプライマー (OPA-04, OPA-07, OPA-14, OPD-08) だけが再生植物体とオリジナル植物体のDNAパターンに明確な違いを示した。他のランダムプライマーについてはDNAパターンが同じかまたはDNAが全く増幅されなかった。マイナーなDNAパターンにわずかな違いが認められたが、メインのDNAパターンには違いが認められない場合もあった。RAPD 分析の結果は再生植物体に現れたいくつかの変異が染色体数の違いではなく、自家受粉によって生じたゲノムのDNAの配列の一部の違いによることを示唆している。第1章で述べたハイブリッドティローズ 'Laura' の若葉由来のOCからの再生植物体には変異が認められなかったことは異なり、ミニローズ 'Shortcake' の自家受粉して得られた未熟種子由来のIEGCからの再生植物体の変異が出現するのは体細胞変異と思われる。Burgerら(1990)が、数種類の*R. hybrida* を交配して得られた未熟種子由来カルスから、両親とは異なる枚数の花弁を持った多くの再生植物体を得ているのは当然のことと思われる。

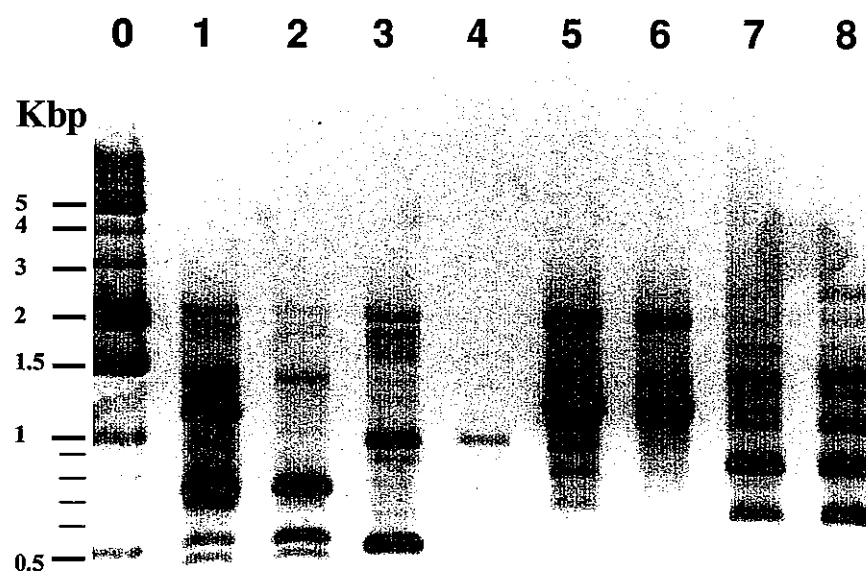


Fig. 3. 5 ‘Shortcake’ のオリジナル植物体 と再生植物体 の
RAPD 分析による比較結果

奇数レーン；オリジナル植物体，偶数レーン；再生植物体，レーン 0；
DNA マーカー

プライマー；レーン 1， 2；OPA-04，レーン 3， 4；OPA-07，
レーン 5， 6；OPA-14，レーン 7， 8；OPD-08

第 4 章

ミニバラ品種 ‘Shortcake’ のImmature Embryogenic Callus からの形質転換体再生

第1節 緒言

前章で、Miniature rose ‘Shortcake’ の自家受粉して得られた未熟種子由来のIEGCからの植物体再生技術が確立したので、本章ではこのIEGCを使用して形質転換体の再生を行い、GUS遺伝子のゲノムへの組込みについて確認することとした (Asano and Tanimoto, 2003) .

第一章で述べた ‘Teneke’ の葉由来のOCは全ての外植片から誘導されたが、不定芽形成率は低く最高で3%であった。一方 ‘Shortcake’ の自家受粉して得られた未熟種子由来のIEGCは、60個の種子からわずかに2片(3.3%)から誘導されたに過ぎないが植物体への再生能力は ‘Teneke’ の葉由来のOCと比較にならない程高く、1.0mg/l BAを含むMS再生培地では平均7.7本シュート/IEGC (約3g/片) が形成された。また ‘Teneke’ の場合は *Agrobacterium tumefaciens* のLBA4404/PBI121株を用いてOCへのGUS遺伝子の導入を行った。遺伝子の導入の成功率はOC 80片中わずか2片 (2.8%) にすぎなかったが、本実験では感染率の高いEHA101/pHTS-35S-GUS (pBI121-Hm) 株を用い、さらに感染率に及ぼすと思われる菌培養液中の菌密度や菌との共存培養中の超音波処理効果についても調べた。

第2節 材料と方法

1. 材料

3年以上の間、温室で栽培したMiniature rose *R. x hybrida* cv ‘Shortcake’ (京成バラ園) を用いた。

2. IEGC の誘導と増殖

自家受粉後3～4週間が経過した約10×15 mmの大きさの果実を採取し、種子 (3～5 mm) を取り出し、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度1.5%) で5分間滅菌した後滅菌水で2回洗浄した。メスで20個の種子を縦方向に半切し、ホルモン無添加のMS培地上に切断面を下にして置床し、25℃で16時間明期/8時間暗期の長日条件下で継代培養を行わずに3ヶ月間培養し、IEGCの誘導を行った。この実験を3回くり返した。

誘導されたIEGCは0.25mg/l BA と0.5mg/l NAA を含むMS培地に移植し、25℃で暗黒下、2～3週間で継代しながら増殖させた。大きく成長したIEGCは2～3 mmの大きさに分割して増殖させた。

3. *Agrobacterium tumefaciens* 仲介による 'Shortcake' のIEGCへのGUS遺伝子導入

3. 1. *Agrobacterium* 菌との共存培養

50 mg/l ハイグロマイシン（和光純薬，日本）を添加した40 mlのYEB液体培地 (0.5% beef extract, 0.1% yeast extract, 0.5% pepton, 0.5% sucrose, 2mM MgSO₄, pH 7.2)を入れた100 mlフラスコ中で，Fig. 4. 1に示す構造のT-DNAを含むベクターを有する*Agrobacterium tumefaciens* EHA101/ pHTS-35S-GUS (pBI121-Hm) strain を30℃ 温水バスシェーカー中で，120 rpmで，2昼夜培養した。遠心によって菌を回収しYEB液体培地で2回洗浄した。

40 ml YEB液体培地を入れた100 mlフラスコ中で再び菌を培養し，スペクトロメーター (U 2000A, 日立, 日本) によって菌培養液の濃度を測定し，菌濃度をOD_{595nm} が0.1, 0.3, 0.77, 1.36 と1.7 になるように調整した40 ml の菌培養液を準備した。20 片の IEGCを菌と15分間共存培養した。一過性 GUS遺伝子発現に及ぼすSAAT (Trick and Finer, 1997, 1998) の効果を明らかにするために，超音波洗浄機 (EYELA, 日本) を用いて，20 片のIEGCと菌の共存培養中 (OD_{595nm} = 0.7) にそれぞれ0, 3, 7, 15, 30 秒間の超音波処理を行った。IEGCを濾紙上に取り出して余分な菌と培養液を除去してからMS再生培地 (MS 培地, 1.0 mg/l BA) に，直接接触しないよう培地の上に敷いた濾紙上に移して 暗黒下，25℃で2日間培養した。

3. 2. 除菌

培地に直接触れたカルスや2日間以上培養した場合は，*Agrobacterium* 菌の増殖が過剰となり，後の除菌が非常に困難であった。500 mg/l カルベニシリン (α -Carboxybenzylpenicillin, SIGMA) を含む水溶液100 mlを入れた300 ml フラスコに IEGCを投入し，120 rpmで2時間震盪除菌した後，白濁した溶液を捨て減

菌水で2回洗浄した。この処理を2回くり返した。

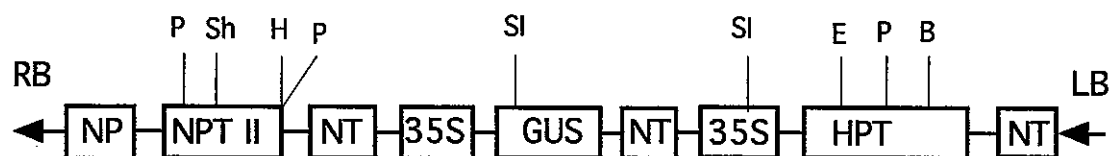


Fig. 4. 1 *Agrobacterium* EHA101/ pHTS-35S-GUS (pBI121-Hm)の
T-DNAの構造図

RB: right border, NP: nopaline synthase promoter, NPT II: neomycin phosphotransferase- II gene, NT: nopaline synthase terminator, 35S: CAMV 35S promoter, GUS: β -glucuronidase gene, HPT: hygromycin phosphotransferase gene, LB: left border. Cutting sites of restriction enzymes are indicated; B: *Bam* HI, P: *Pst* I, Sh: *Sph* I, H: *Hin* dIII, SI: *Sal* I, E: *Eco* RI.

3. 3. 選抜培地へのハイグロマイシン添加量の決定

約5 mmのIEGC 4片を1 mg/l BA, 500 mg/l カルベニシリンと0, 5, 10, 20, 40 mg/l ハイグロマイを含むMS 培地上に移植して2週間毎に継代しながら40日間培養を行った

3. 4. IEGCのGUS検定 (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987)

除菌処理が終わったIEGCを再生培地 (MS 培地, 1 mg/l BA, 500 mg/l カルベニシリン) 上に移し 暗期で3日間培養後、除菌して第2章で述べたのと同様の方法でGUS検定を行った。

4. 形質転換IEGCの植物体再生時のNAAの最適量の決定

NAAが形質転換IEGCからの植物体再生に及ぼす効果を調べるために, 1 mg/l BAと0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4mg/l NAA, 500 mg/l カルベニシリン, 35 mg/l ハイグロマイシンを含むMS選抜再生培地で, 25℃で2～3週間ごとに継代しながら

6 ヶ月間培養を行った。カルベニシリン濃度は2 ヶ月後 500 mg/l から無添加としたが、菌による汚染は認められなかった。再生したシュートは0.25 mg/l IBA, 35 mg/l ハイグロマイシンを含む1/2濃度のMS発根培地 (15g/l Sucrose, 2.5g/l Glerite) (Hasegawa, 1980) で25℃, 16 時間明期/8 時間暗期の条件下で2 ~ 3 週間毎に継代しながら1 ヶ月間培養を行った。発根した小植物体は馴化後、隔離温室の土壤に移植した。

5. 各組織のGUS検定 (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987)

花、葉、根等はそのまま、茎はカミソリの刃で横に薄くスライスしてGUS検定を行って顕微鏡でブルースポットを観察記録した。葉についてはX-GLUCの組織への浸透の度合いをチェックするために葉の主葉脈に直角方向に約5mm間隔でカミソリの刃で葉に切れ目をいれたサンプルについても第2章で述べた同様の方法でGUS検定を行った。

6. GUS-DNAプローブ作製方法

0.2 μ g/ μ l のpHTS-35S-GUSを鋳型とし、1組の5'-primer(5'-ACACCGAT ACCATCAGCGAT-3') と 3'-primer(5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGT-3') (Tsuchiya *et al.*, 1995; Rashid *et al.*, 1996) を使用してPCRを行ったD10 \times buffer (250 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl, 1 % Triton X-100) 3.2 μ l, 1.2 mM dNTPs 1.6 μ l, 10 pMの5'-primerと3'-primerそれぞれ1 μ l, 5,000 u/ml γ Taq DNA polymerase (TOYOBO) 0.1 μ l と蒸留水 13.6 μ l から構成した混合液 (合計20 μ l) を PCR用の200 μ l マイクロチューブに入れて静かに攪拌した。最後に1滴のミネラルオイル (SIGMA) を載せた。PCR 増幅器 (TECHNE, Techgene) を用いて94 $^{\circ}$ C \times 0.5 分, [94 $^{\circ}$ C \times 0.5 分, 55 $^{\circ}$ C \times 2 分, 72 \times 3分] \times 40 サイクル, 72 $^{\circ}$ C \times 8 分の条件下(Torres, 1993) でDNAを増幅した。PCR産物をDNAラダーマーカーと共に、0.8 mg/l ethidium bromideを含むTBA バッファー (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA), 0.8 % アガロースゲル中で100 ボルト, 80 分間電気泳動を行った。UV灯下でGUS遺伝子のフラグメント (430 bp) を切り出し DIG DNA Labeling and Detection Kit (BOEHRINGER MANNHEIM)のプロトコールに従ってプローブのラベリングを行った。

7. PCR

‘Shortcake’ のオリジナル植物体（1 個体）と形質転換植物体（7 個体）の幼葉 0.5g を液体窒素で冷却し乳鉢と乳棒を用いて充分細かく粉碎した。DNA 抽出純化キット (NIPPON GENE, ISOPLANT II) を用いて、ゲノム DNA をサンプルから抽出した。100 ng / μ l DNA (オリジナル植物体及び再生植物体) 0.5 μ l を鋳型とし、1 組の 5'-primer (5'-ACACCGATACCATCAGCGAT-3') と 3'-primer (5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGT-3') (Tsuchiya *et al.*, 1995; Rashid *et al.*, 1996a) を使用して PCR を行った。10 \times buffer (250 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100) 3.2 μ l, 1.2 mM dNTPs 1.6 μ l, 10 pM の 5'-primer と 3'-primer それぞれ 1 μ l, 5,000 u/ml γ Taq DNA polymerase (TOYOBO) 0.1 μ l と蒸留水 13.6 μ l から構成した混合液（合計 200 μ l）を PCR 用の 200 μ l マイクロチューブに入れて静かに攪拌した。最後に 1 滴のミネラルオイル (SIGMA) を載せた。PCR 増幅器 (TECHNE, Techgene) を用いて 94 $^{\circ}$ C \times 0.5 分, [94 $^{\circ}$ C \times 0.5 分, 55 $^{\circ}$ C \times 2 分, 72 \times 3 分] \times 40 サイクル, 72 $^{\circ}$ C \times 8 分の条件下 (Torres, 1993) で DNA を増幅した。全ての PCR 産物を DNA ラダーマーカーと共に、0.8 mg/l ethidium bromide を含む TBA バッファー (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA), 0.8 % アガロースゲル中で 100 ボルト, 80 分間電気泳動を行った。バッファー (0.5 mM NaOH, 1.5M NaCl) を用いてアガロースゲル上の DNA をメンブレン (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Ireland) にブロッティングした。

8. GUS-DNA プローブによる PCR-サザンハイブリダイゼーション

ブロッティングしたメンブレンを乾燥し、DIG DNA Labeling and Detection Kit (BOEHRINGER MANNHEIM) のプロトコールに従ってラベリングした GUS-DNA プローブを用いてハイブリダイゼーションと検出を行った。

9. HPT- RNA プローブ作成

本研究では前述の GUS-DNA プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを実施したが、良好な結果が得られなかったため今回は RNA プローブを使用した。理

由はRNAプローブの方が、DNAプローブより感度が高からである。HPT 遺伝子(1,023 bp)のDNA フラグメントの全長を得るために、制限酵素*Bam* HIの2ヶ所の切断サイトの間にHPT 遺伝子を持つプラスミド pCH を*Bam* HIで消化して挿入した。このDNA フラグメントを*Bam* HIで切断したpBluescript II SK(+)(TOYOBO)のマルチクローニングサイトに挿入した。DNA フラグメントのサブクローニングにはcompetent *E. coli* HB101 (TOYOBO)を使用した。ブルー/ホワイトのプラーク選別後、形質転換された*E. coli* HB101のポジティブプラークを100 mlの液体 LB 培地(tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 6,7)を入れた300 ml フラスコ中で、37 °Cのシェーカーで、100 rpmで一昼夜培養した。

プラスミドを large-scale preparation (Sambrook et al., 1989)のプロトコールに従って抽出し、制限酵素*Xba* Iで消化し、proteinase K (SIGMA)で純化してRNAプローブのDNA鋳型とした。RNAプローブはDIG-RNA labeling Kit. SP6/T7 (BOEHRINGER MANNHEIM)のプロトコールに従ってラベリングした。

10. HPT- RNAプローブ によるサザーンハイブリダイゼーション

‘Shortcake’ のオリジナル植物体 (1 個体) と形質転換植物体と思われる再生植物体 (5 個体, 7個体中2個体は枯死) の幼葉1gを液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒を用いて充分細かく粉碎した。DNA抽出純化キット(NIPPON GENE, ISOPLANT II)を用いて、ゲノムDNAをサンプルから抽出した。それぞれのゲノムDNA15 μ gを*Eco* RIで消化して0.8 % のアガロースゲル上で電気泳動した。UV灯下でDNAが充分消化されていることを確認後、前述のメンブレンにブロッティングした。メンブレンを乾燥後約1 kbの HPT- RNA プローブを用いてDIG RNA Labeling Kit SP6/T7, CDP-Star TM, and DIG DNA Labeling and Detection Kit (BOEHRINGER MANNHEIM).のプロトコールに従い HPT 遺伝子のハイブリダイゼーションと検出を行った。

11. 染色体数の比較方法

Ploidy analyzer PA (Partec, PA型, Germany)を用いて ‘Shortcake’ のオリジナル (1 個体) と形質転換植物体と思われる再生植物体 (5 個体)の染色体数を比較した。未展開の幼葉 1 枚 (約5×5 mm) をプラスチック板上に乗せ、その上に核

較した。未展開の幼葉1枚（約5×5 mm）をプラスチック板上に乗せ、その上に核抽出液 (Partec, high resolution DNA kit type-P)を数滴落とし、剃刀の刃で幼葉をできるだけ細かく切り刻み、室温で3分間反応させた。フィルター(30 μm)で濾過した液に少量の核染色液 4'-6-diamino-2-phenylindole dye solution (Partec, high resolution DNA kit type-P)を加えて室温で3分間反応させた。ploidy analyzer (Partec, PA型, Germany)を用いて切片溶液に紫外線を照射することで核から放射される蛍光の強度のピーク位置を測定し、染色体数を比較した。

第3節 結果と考察

Agrobacterium 仲介法による遺伝子導入時に、カルスと菌の共存培養液中の菌濃度は通常飽和状態よりも菌濃度が低く、菌が増殖する初期段階から急増している対数増殖段階の方が菌の感染率は良いとされている(Curtis, 1999)。フェノール化合物例えばAcetosyringoneやSylingonaldehydeの添加も有効とされている(Holford et al., 1992; Rashid et al., 1996b)。GUS 遺伝子の一過性発現の頻度についてはTable 4. 1に示すように初期段階($OD_{595nm} = 0.1$)から飽和段階($OD_{595nm} = 1.72$)までの全域において35%~55 %とかなり高く、飽和段階でも40%であった。

Table 4. 1. 液体YEB培地中でIEGCを*Agrobacterium* EHA101/pHTS-35S-GUS (or pBI121Hm)と共存培養した場合のGUS遺伝子発現頻度に及ぼす菌濃度 (OD_{595nm}) の効果

OD_{595nm}	0.10	0.30	0.77	1.36	1.72
IEGC数					
(A)	20	20	20	20	20
GUS (+)					
IEGC数 (B)	10	11	7	8	8
(B)/(A) %	50	55	35	40	40

Fig. 4. 1は本研究に用いた*Agrobacterium* EHA101/pHTS-35S-GUSの T-DNA フラグメントの構造である。SAAT(Trick and Finer,1997,1998) は遺伝子導入の困難な植物種（例えば大豆, Cowpea, 小麦 やトウモロコシ）に対してGUS 遺伝子の一過性発現の頻度を大幅に向上させることが報告されている。しかし本研究に使用した‘Shortcake’のIEGCの場合SAATはさほど有効ではなく Table 4. 2に示すように超音波を3秒加えた場合にわずかに5 %改善されただけだった。この理由は明らかではないが、おそらくIEGC組織の細胞壁の物理化学的強度が*Agrobacterium* や超音波のキャビテーションに対して上記の植物種よりもはるかに弱いためではないかと考えられる。超音波を15秒以上加えた場合はIEGC組織の損傷が大きくIEGCの色が褐色に変化し、ついにはすべて死滅してしまった。

Table 4. 2 液体YEB培地中でIEGCを*Agrobacterium* EHA101/pHTS-35S-GUS (or pBI121Hm)と共存培養した場合のGUS遺伝子発現頻度に及ぼす超音波処理効果

超音波処理					
時間 (秒)	0	3	7	15	30
IEGC数					
(A)	20	20	20	20	20
GUS (+)					
IEGC数 (B)	11	12	8	2	0
(B)/(A) %	55	60	40	10	0

Fig. 4. 2は選抜のためのハイグロマイシンの適切な添加量を決めるためにハイグロマイシンの添加量を0, 5, 10, 20, 40 mg/lと変化したMS培地上でIEGCを40日間培養して個々のIEGCの重量増加比を測定したものである。ハイグロマイシン無添加の培地では4片すべてのIEGCは順調な重量増加を示しているが、5 mg/lでは4片中2片のIEGCの重量増が鈍化している。10 mg/lでは4片とも重量増が鈍化しており、20 mg/lでは4片共26日目から重量増は認められない。40 mg/lでは19日

目から重量増は停止している。重量増が認めらなくなったIEGCは褐変し、やがて全て死滅した。

選抜のためのハイグロマイシンの添加量としては20 mg/lで良いと考えられるが本実験では安全を見て35 mg/lとした。

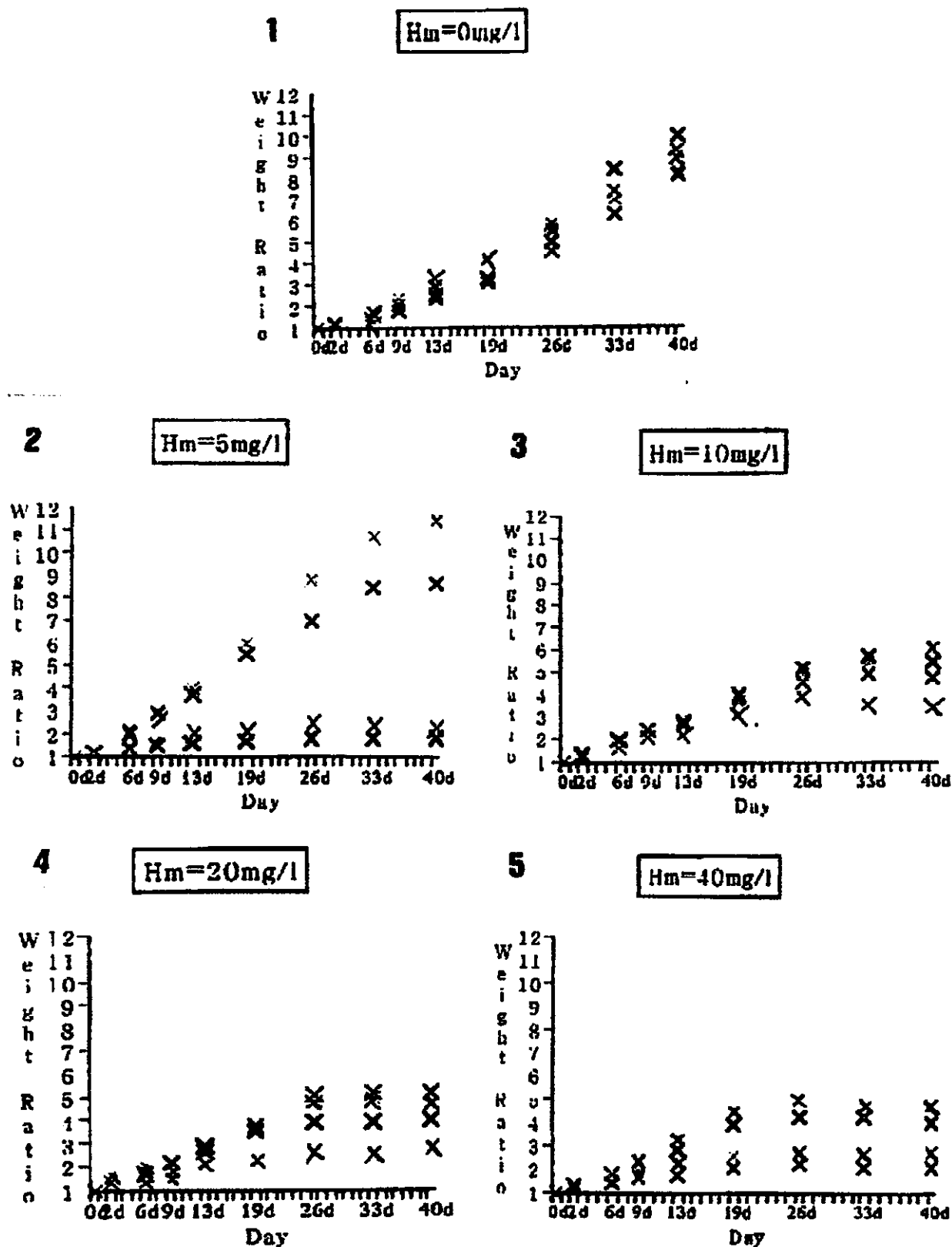


Fig. 4. 2 IEGCの成長に及ぼすハイグロマイシンの阻害効果

MS選抜再生培地(MS培地, 1 mg/l BA, 0, 5, 10, 20, 40 mg/l

ハイグロマイシン)上でIEGCを40日間培養した場合の個々のIEGCの重量増加

比率 IEGC : 4片/培地

Fig. 4. 3A は ‘Shortcake’ の非形質転換植物体の自家受粉で得られた未熟種子由来のIEGCを0.25 mg/l BA と0.5 mg/l NAA を含むMS培地上で、25 °C暗黒下で1ヶ月間培養したものである。色は淡黄色で、形態は球状または葉状の構造であり、ほぐれやすいのが特徴であった。Fig. 4. 3BはIEGCを *Agrobacterium* と共存培養し滅菌後選抜再生培地上で25 °Cで16 時間明期/8 時間暗期の条件下で1ヶ月間培養した後の GUS 検定の結果を示す。一過性のGUS遺伝子の発現が強く現れた。Fig. 4. 3C は形質転換IEGC選抜再生培地上で25 °Cで16 時間明期/8 時間暗期の条件下で2ヶ月間培養した状態である。シュートの誘導が認められた。Fig 4. 4Aは4ヶ月間（初めの2ヶ月間は選抜再生培地で、次の2ヶ月間はカルベニシリン無添加の選抜再生培地上で培養）上記と同一条件下で継代培養したIEGCである。IEGC上に現れた多くのグリーンスポットは将来はシュート上の葉へと発達して行くものである。Fig 4. 4Bは6ヶ月間（初めの2ヶ月間は選抜再生培地で次の4ヶ月間はカルベニシリン無添加の選抜再生培地で培養）上記と同一条件下で継代培養したIEGCである。IEGC上に健全な多くのシュートが発生した。

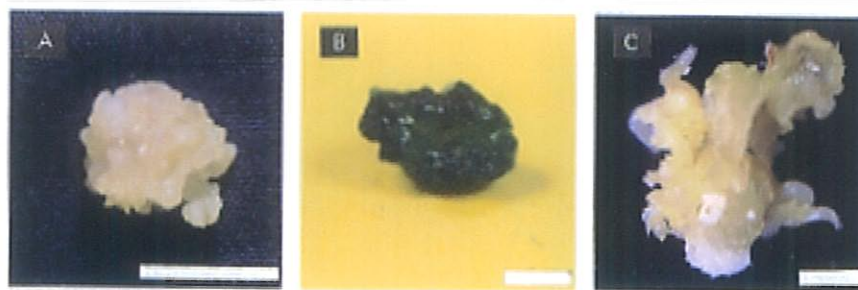


Fig. 4. 3 未熟種子由来のIEGC

非形質転換 IEGC(A), *Agrobacterium* と共存培養し選抜再生培地上で25 °C で16 時間明期/8 時間暗期の条件下で1 ヶ月間培養した後GUS 検定をした形質転換 IEGC(B), 形質転換IEGCを選抜再生培地上で上記条件で2 ヶ月間培養して出現したシュート(C) (bar= 1 cm)

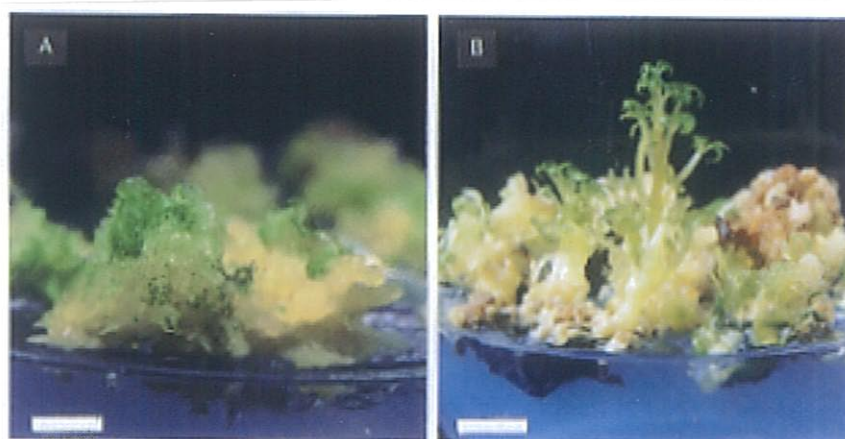


Fig. 4. 4 ‘Shortcake’ の形質転換IEGCからのシュート再生
IEGC上に出現した多くのグリーンスポット(A), IEGC上に
再生したシュート(B) (bar= 1 cm)

Table 4. 3は形質転換IEGCからのシュート再生に関する選抜再生MS培地中の植物ホルモンの影響を示した。最適条件は1 mg/l BAと0.1 mg/l NAAとの組み合わせであった。

ハイグロマイシンで選抜されたIEGCからのシュート再生数は1 mg/l BAの場合1.46本/IEGCであり、非形質転換IEGCのシュート再生頻度は同じく1 mg/l BAの場合7.7本/IEGC (Asano and Tanimoto, 2002) であったので、非形質転換IEGCと比較すると1/5以下である。この原因は選抜再生培地に含まれるハイグロマイシンやゲノムに組み込まれたT-DNA等がシュート再生能力に阻害的に働いているためと考えられる。

健全なシュートは前述の選抜発根培地に移植し1ヶ月間25℃で16時間明期/8時間暗期の条件下で培養した。形質転換したと思われる25片のIEGCから65本のシュートが発生し、65本のシュートのうち32本のシュート(49%)に発根が認められた。32本の小植物体を隔離温室の土壌に移植した。32本の小植物体のうち7本が生き残った。この生存率はかなり低い。その理由は形質転換体と思われる小植物体の根はオリジナルの植物体と比較すると発達が不十分なために乾燥に弱いのではないかと考えられる。生き残った7本の個体は順調に成長して1年半の間、春と秋に2度花を咲かせた。

Table 4. 3 形質転換IEGCのシュート再生に関する選抜再生MS培地中の植物ホルモンの影響

植物ホルモン(mg/l)		IEGC数	シュート数	シュート数/IEGC数
BA	NAA	(A)	(B)	(B)/ (A)
1.0	0	168	245	1.46
1.0	0.05	168	351	2.09
1.0	0.1	448	1415	3.16
1.0	0.2	168	25	0.15
1.0	0.4	168	0	0

(IEGC, 1片の新鮮重量は約3g)

Fig. 4. 5 A は ‘Shortcake’ のオリジナルの植物体の花, Fig. 4. 5 BはIEGCからの再生植物体の花である. 再生植物体の花に現れる変異については既に第3章第3節で述べた如く、花の直径には変化は認められないが花弁数は再生植物体の方が少ない(約70%). オリジナルの植物体の花弁裏側の色は白色であるが再生植物体では白色が殆ど退色しているので、花の色はオリジナルより透明感のある赤色である. Fig. 4. 5C, D, Eは形質転換植物体の最初のシュートに現れた典型的な3種類の花の変異で、Fig. 4. 5A のオリジナルの植物体の花とは極めて異なっている. しかしながら興味深いことに2番目以降のシュートに現れた花はFig. 4. 5 C, D, Eの変異の現れた花とも異なっているが、再生植物体の花とは大変良く似ている. なぜ最初のシュートにだけに不安定な変異が現れるのか、その理由は不明である.



Fig. 4. 5 オリジナル植物体とその自家受粉種子由来のIEGCからの再生植物体と形質転換IEGCからの再生植物体の花の比較

オリジナル植物体の花 (A), その自家受粉種子由来のIEGCからの再生植物体の花 (B), 形質転換IEGCから再生した植物体の最初のシュートの花(C, D, E), 2 番目以降のシュートの花 (F) (Bar =1 cm)

Fig. 4. 6 に形質転換体の各種器官のGUS 遺伝子の発現を示した。Fig. 4. 6Aは花全体をGUS 検定したものである。全ての雌蕊、一部の葯と花芯にGUS 遺伝子の発現が見られたが、花弁にはほとんど認められない。しかしながら花弁（ランダムに20枚の花弁を選んでテストした。）を 0.1 mg/l BA , 0.5mg/l NAAを含むMS培地で 25 ℃, 暗黒下で1ヶ月間培養して誘導した全てのカルスはFig 6Bに示すごとく強いGUS 遺伝子の発現を示した。Fig. 4. 6Cは GUS遺伝子導入を行った再生植物体の葉のGUS 検定を行ったものであるが、薄い拡散した青色しか示さなかった。そこで上記の花弁と同じ方法で、葉から誘導したカルス（ランダムに20枚の葉を選んでテストした）について調べたところ、それらのすべてに強いGUS 遺伝子の発現が示された (Fig. 4. 6D) 。非形質転換体についても同様に花弁と葉から誘導した全てのカルスについてもGUS 検定を行ったがブルースポットは全く認められなかった。これらの原因は明らかではないが、花弁と葉の細胞壁はカルスの細胞壁より物理化学的にX-GLUCの細胞内への浸透に対する抵抗が強いためではないかと考えている。従って花弁や葉の組織の細胞内ではGUS 遺伝子の発現があるにもかかわらず、GUS 検定の結果は殆どGUS (-) かまたは淡い青色しか示さなかったのは、細胞壁でX-GLUCの細胞内への浸透が殆ど阻止されたのではないかとと思われる。

Fig. 4. 6Eは形質転換体の若い茎の横断面の写真で維管束と木部にGUS 遺伝子の発現が認められた。Fig. 5Fは根のGUS 検定の結果である。Fig. 4. 6F (左) は非形質転換体の根でブルースポットは全く認められなかったが、 Fig. 4. 6F (右) の形質転換植物体の根全体にGUS 遺伝子の発現が認められた。

Fig. 4. 7は形質転換体の葉の主葉脈に直角に約5mm間隔で剃刀の刃で切り込みを入れてからGUS 検定を行った結果である。切り込みを入れた両側の部分だけが強く青色になることはX-GLUCの細胞内への浸透が殆ど阻止されていることを示している。非形質転換体の葉では青色は全く認められなかった。この結果は前述のGUS 検定を行った花弁や葉に明確な青色が認められなかった原因を支持するものである。

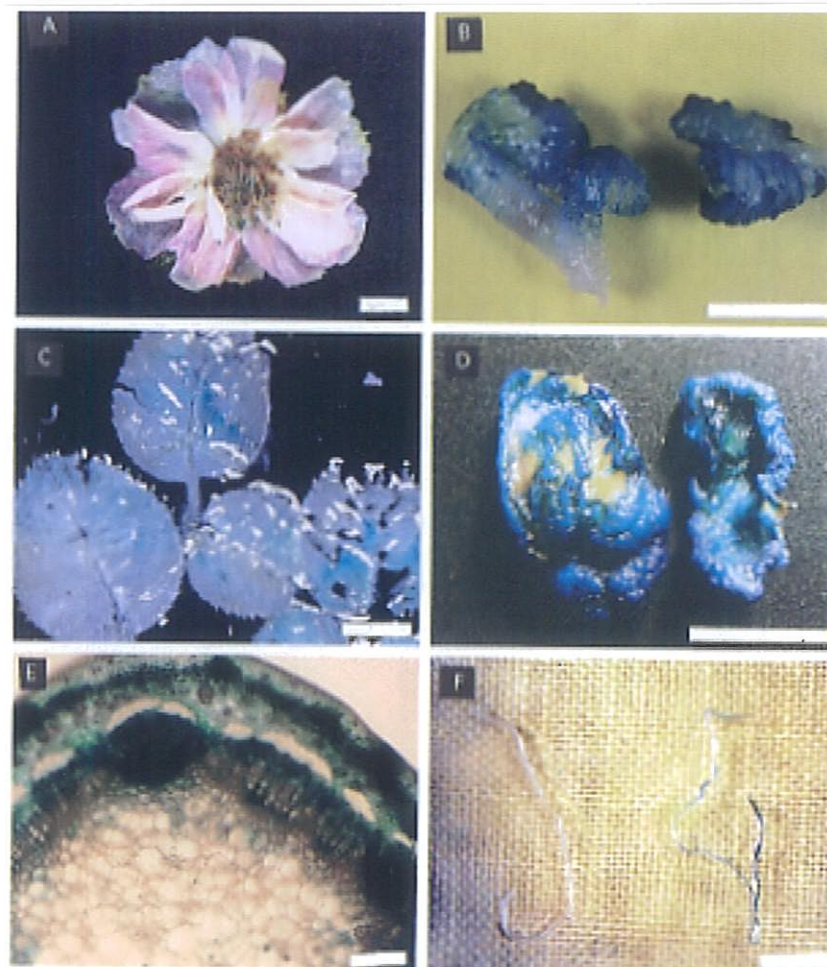


Fig. 4. 6 形質転換植物体の各種器官におけるGUS遺伝子の発現

花 (A), カルス誘導培地上で 25 °C, 暗黒下で1ヶ月間花弁を培養して誘導したカルス(B), 葉 (C), 花弁の場合と同一条件で葉から誘導したカルス(D), 形質転換体の若い茎の横断面 (E, bar = 3 mm), 非形質転換植物体(F, 左) と 形質転換植物体 (F, 右)の若い根 (E 以外 : bar = 1 cm)

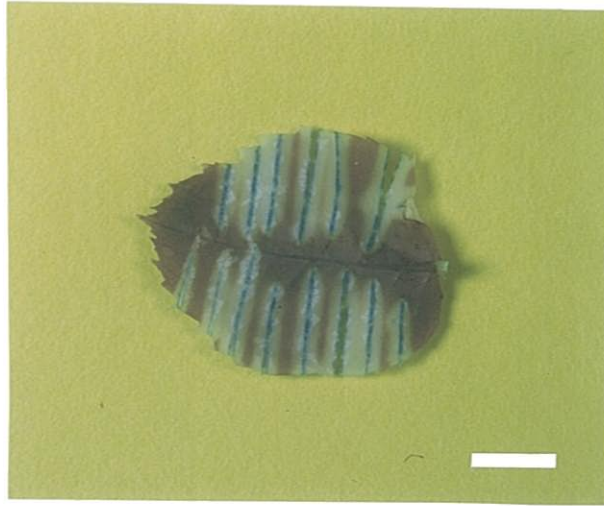


Fig. 4.7 剃刀の刃で切り込みを入れた形質転換植物体の葉のGUS 検定結果
(bar: 1 cm)

Fig. 4. 8はDIG-ラベリングした430 bpの GUS-DNA プローブを用いてPCR-サザンブロット分析を行った結果である. 非形質転換植物体1個体は当然ながらGUS (-), 形質転換植物体7個体全てがGUS (+)であった. レーン p はプラスミッドpBI121を鋳型とし1組の5'-primer(5'-ACACCGATACCATCAGCGAT-3')と3'-primer(5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGT-3') (Tsuchiya *et al.*, 1995; Rashid *et al.*, 1996a) を使用してPCRを行ったPCR産物で, 430 bpの GUS 遺伝子フラグメントである.



Fig 4. 8 オリジナル植物体（1 個体）と形質転換IEGCからの再生植物体（7 個体）の430 bpの GUS-DNA プローブを用いたPCR-サザンブロット分析結果

レーンp: 430 bpのGUS遺伝子フラグメント,

レーン0：オリジナル植物体, レーン1-7: 形質転換植物体

Fig. 4. 9は非形質転換体1 個体と形質転換体5 個体（7 個体中2 個体は枯死）について DIG-ラベリングした約1 k bpの GUS-RNA プローブを用いてサザンブロット分析を行った結果である。プラスミド pHTS-35S-GUSのT-DNA フラグメントは Fig. 4. 1に示したように、ハイグロマイシン抵抗遺伝子上に1 箇所Eco RIの切断サイトを持っている。従ってもし形質転換体5 個体がお互いに独立した個体ならばハイブリダイゼーションのパターンはそれぞれ異なっていることが期待される。しかしFig. 4. 6に示したように、全ての形質転換体（レーン2～6）のパターンは全く同一で、一つのメインバンド（約4 kbp）と二つのマイナーバンドから構成されていた。オリジナル植物体（レーン1）はノーバンドであった。この事は形質転換体5 個体は1 個の形質転換IEGCから再生したもので遺伝的にはクローンであることを示唆している。

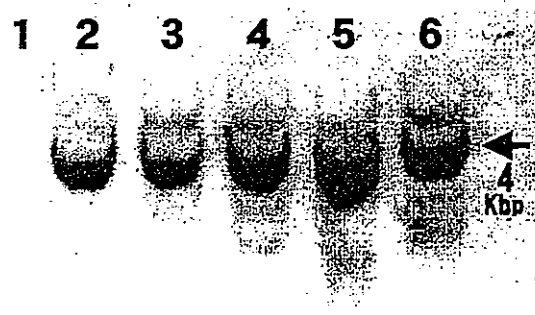


Fig. 4. 9 オリジナル植物体（1 個体）と形質転換植物体（5 個体）の
HPT- RNAプローブを用いたサザンブロット分析結果

レーン1: オリジナル植物体, レーン2～6: 形質転換植物体

ゲノム DNA : 15 μ g/レーン (*Eco* RIで消化)

オリジナル植物体 1 個体と形質転換体 5 個体の染色体数の比較を, すでに報告した方法 (Asano and Tanimoto, 2002) で行ったが相違は認められなかった. いずれも 4 倍体である事が判明した.

第5章

バラのトゲに関する形態学及び組織化学

第1節 緒言

トゲのないバラは魅力が半減すると思う人は少数派だが存在する。逆に、バラを栽培したいけれど、針先のようなトゲがどうも気になると思っている人はかなりいるだろう。トゲがあっても先端が丸いか、あるいはトゲ全体が形成初期のように柔らかく触っても痛くないようなバラが作出できればバラの需要はもっと増加するはずである。1804年ナポレオンの皇后ジョセフィーヌがパトロンとなって、大々的にバラの人工交配が行われるようになってから、今日まで200年間、大勢のバラ育種家によって人工交配による品質改良がなされて来た。勿論意図的にまたは偶然にトゲのないバラも作出された。例えば、ミニバラ *R. x hybrida* cv. ‘Cinderella’, Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. ‘Smooth Angel’, ‘Smooth lady’, ‘Smooth Perfume’, ‘Smooth Stain’, ‘Smooth lady’, ‘Smooth Violet’, フロリバンダローズ *R. hybrida* cv. ‘Smooth Melody’, ツルバラ *R. hybrida* cv. ‘Summer Snow’, ‘Harukaze’ 等である。トゲはバラにとって大切な器官の一つであるには違いない。おそらくは、昆虫や草食動物から食べられたり、踏みつけられないように自分の身を守るため、または急斜面を這い上がるためのフックの役目などが考えられる。しかし野生種でトゲのないバラ (*R. banksiae* Aiton ‘Alba’, *R. banksiae* Aiton *Lutea* Lindy, *R. glauca* ‘Pourret’, *R. chinensis viridiflora* 等) も現存することを考えると、トゲはバラが生き残るために必須の器官ではないと思われる。

植物体の地上部の先端が尖った構造の器官は一般的には *spine*, *prickle*, *thorn* などとあまり区別することなく用いられている。これらの器官の総称は *emergence* (Bell, 1991) と言われている。バラのトゲの場合は *prickle*, *thorn* の両方が用いられているが正しくは *prickle* であろう。バラとサンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) のトゲが維管束組織をもっていない事はすでに報告されている (Kumazawa, 1979)。Hybrid Tea Rose には、*prickle* のほかにはるかに小さいトゲである *acicle* (Hicky and King, 2000) を、地上に近い茎の部分や葉の裏側の葉脈上に持っているものもある。以後本論文では、*acicle* と断らない限りトゲは *prickle* を意味することとする。バラのトゲについてのまとまった文献が見当たらないので、トゲについて理解するために、まずその形態と組織の調査から始めることとした。

第2節 材料と方法

1. 材料

実験に使用したバラの写真をFig. 5. 1に示した. Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' (Fig. 5. 1A) とミニローズ *R. x hybrida* cv. 'Shortcake' (Fig. 5. 1B), また比較のためにサンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) とユズ (*Citrus junos*) も使用した.

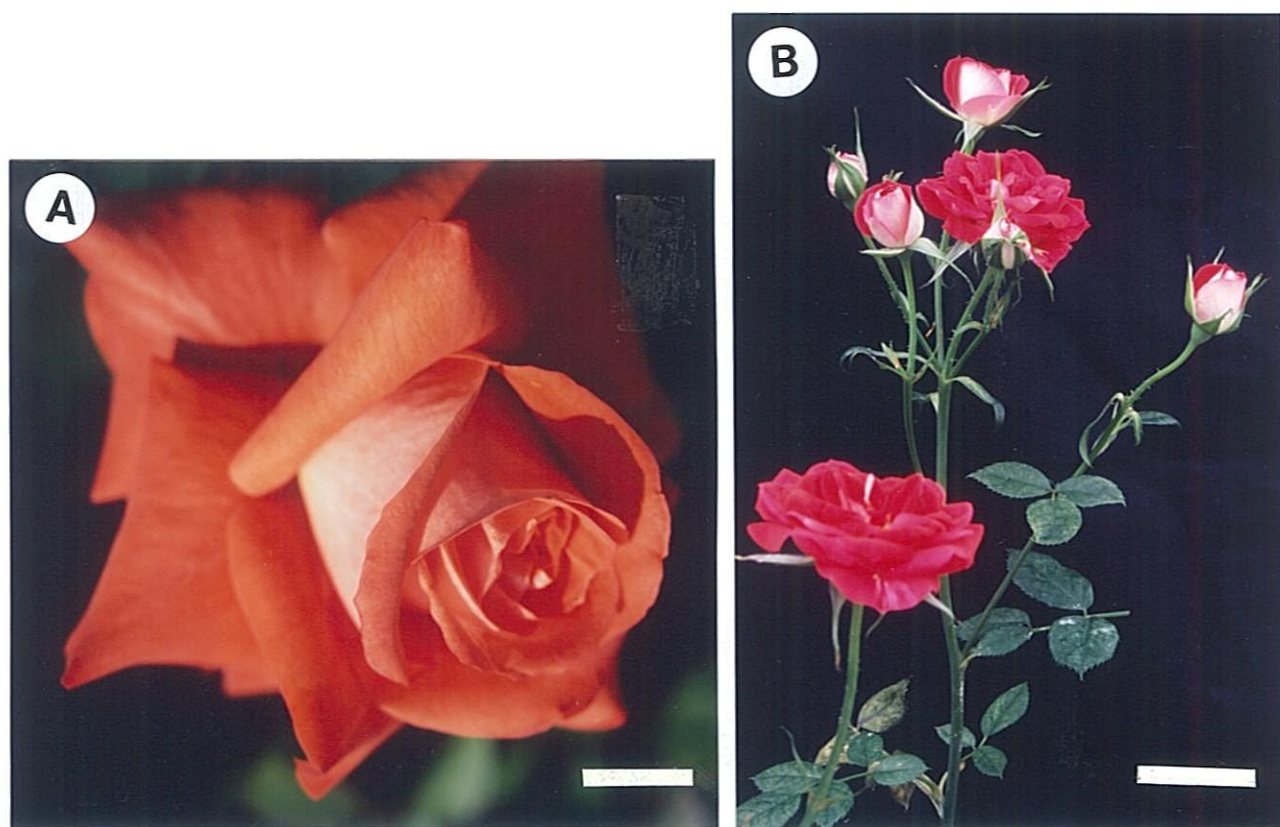


Fig. 5. 1 実験に使用したバラ

Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' (A),
ミニローズ *R. x hybrida* cv. 'Shortcake' (B) (bar = 2 cm)

2. ‘Laura’ のprickleとacicle発生初期段階の観察方法

保護器官を除去した長さ3.3mmの腋芽と、若葉を除去した長さ20 mmの若いシュート上のprickleとacicleを実体顕微鏡で観察し撮影記録した。

3. ‘Laura’ のトゲの相対伸長曲線の測定方法

新しく成長を始めた3本のシュートを任意に選び、それぞれのシュート上の1個のトゲの先端部を赤の、基部を黒の塗料でマーキングして、どの部分が伸長するかを調べた。トゲが存在する部分の節間の長さと直径をノギスで直接測定した。トゲの長さは直接測定が困難なのでデジタルカメラで撮影してコンピュータに取り込み間接的にノギスで測定した。トゲの基部の長さの中心点と先端部との長さをトゲの長さとした。

4. ‘Laura’ のシュート上のprickle とacicleの位置の分布と長さの測定方法

十分に成長したシュートの葉をすべて除去し、剃刀で表皮の部分をシュートの上から下へ切り、表皮を剥ぎ取った後（表皮は簡単に手で剥ぎ取ることができる。）、平らに広げてprickle とacicleの位置の分布と長さをノギスで測定した。

5. ‘Laura’ , ‘Shortcake’ , サンショウのトゲ (prickle) とユズのトゲ (thorn) 組織の観察方法

トゲを採取後、酢酸3 : エタノール1の混合液に浸して組織を固定した後、エタノールに浸して水を置換し、さらにn-ブタノールでエタノールを置換し、最後にn-ブタノールをワックスで置換した。ミクロトームでトゲを縦または横方向に15 μ mの厚さにスライスした。キシロールでワックスを溶かしてエタノールで置換した後、ファーストグリーンで30秒～1分間常温で染色し、さらにサフラニンで5時間～1昼夜染色して最後にバルサンで固定し顕微鏡で観察した (Ruzin, 1999)。

6. ‘Laura’ のトゲ組織中のリグニン局在の観察方法

トゲを剃刀で縦方向に半切し、phloroglucinolで30分または3時間常温で染色し

た (Ruzin, 1999)．リグニン化した細胞は赤色に染まるので，それを観察してリグニンの局在を調べた．

第3節 結果と考察

1. ‘Laura’ の発生初期段階のprickleとacicle

prickleとacicle の発生の初期段階の写真をFig. 5. 2に示した．Fig. 5. 2Aに示すようにprickleの発生時期は葉原基とほとんど同時で，形状はマイクロドーム状であった．若いシュート上の大きいトゲのグループがprickleで小さなトゲのグループがacicleである．Fig. 5. 2Cにはacicleの拡大図を示したが，興味深いことに初期段階のacicleの形状は先端が平らなマッシュルーム状であった．成長につれて先端が硬化し，シャープで小さな円錐状のトゲになった．

2. ‘Laura’ のトゲの相対伸長曲線

Fig. 5. 3に示すように3種の相対伸長曲線の形は互いに良く似ているが，最終の長さはシュート上の場所によりかなり異なっていた．トゲの急速な伸長は2週間でほとんど完了した．しかし周囲の環境すなわち，温度，湿度，日照時間等にも左右された．シュートの中央部の節間が最も長く伸長するので，その節間部分のトゲもまた他の部分よりも大きく成長したものが多かった．Fig. 5. 4には同じトゲの連続8日間の伸長過程を示した．トゲの先端部の赤い部分は殆ど伸長していないのに反し基部の黒い部分は大きく伸びていた．トゲは先端から伸長するのではなく，主として基部から盛り上がるように伸長した．最初トゲはシュートにそって上を向いていたが，伸長するにつれてトゲの先端部は次第に，シュートと直角になるように回転しながらシュートから離れ，先端部は徐々にシャープになった．更に伸長すると先端がやや下向きになり遂にはフック状になった．

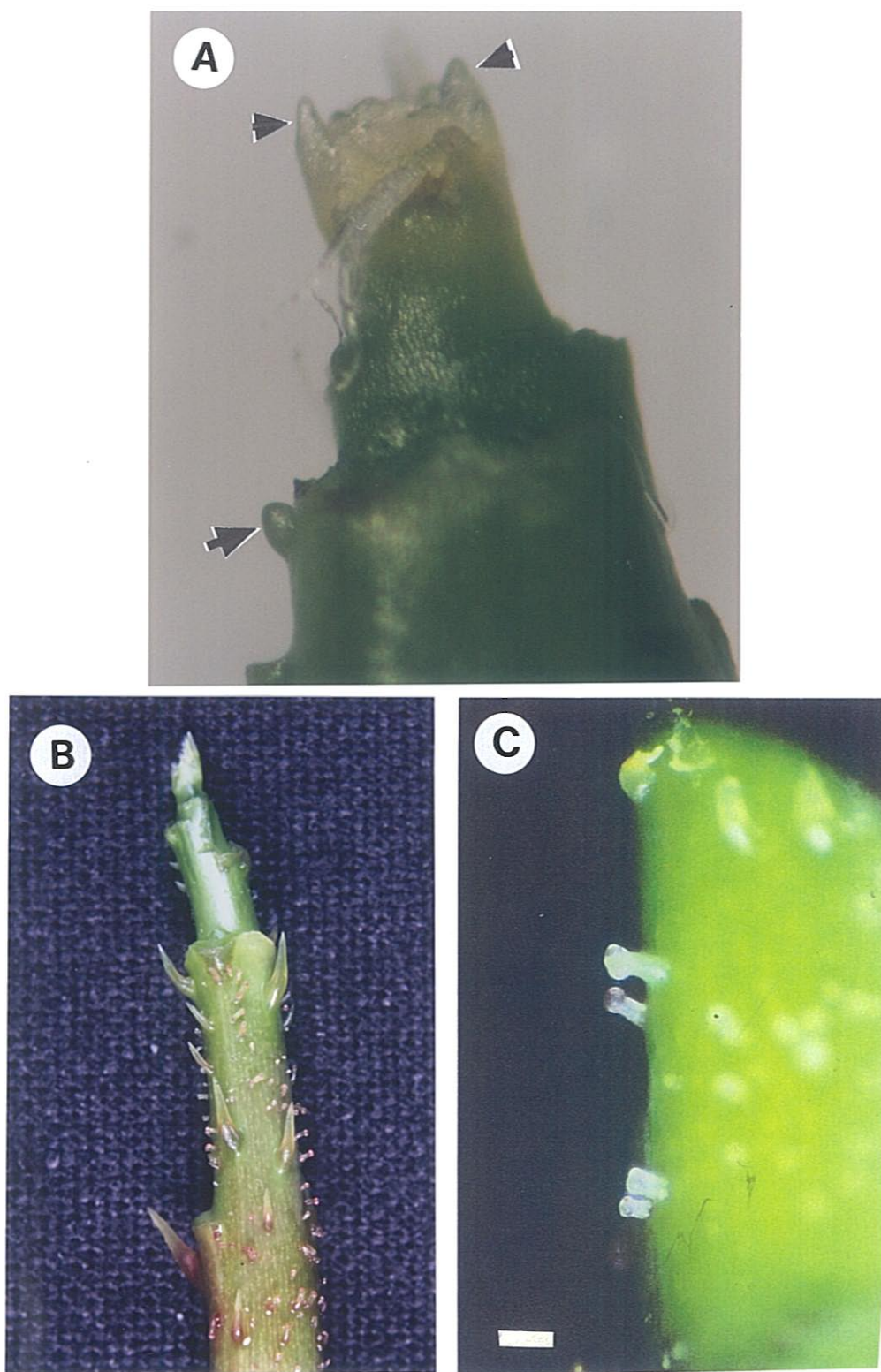


Fig. 5.2 ‘Laura’ トゲの発生初期段階におけるのprickleとacicle

(A) 保護器官を除去した全長3.3mmの腋芽上の prickle (➡) と葉原基 (▲) , (B) 葉を除去した全長2 cmのシュート上の prickle (大) とacicle (小) , (C) 拡大したacicle (bar = 1mm)

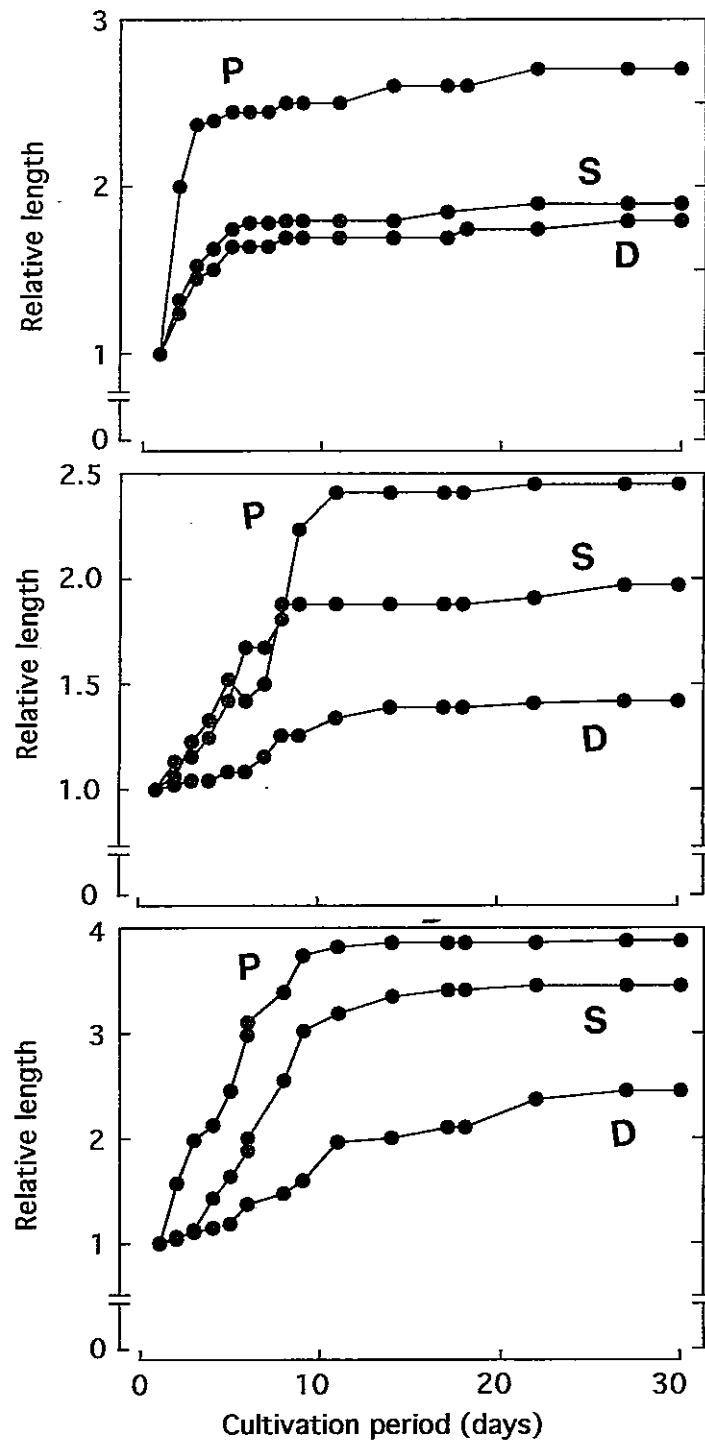


Fig. 5. 3 ‘Laura’ の任意に選択した 3 本のシュート上のトゲとトゲが存在する節間の長さ及び節間の直径の相対伸長曲線

prickleの長さ (P) , 節間の長さ (S) , 節間の直径 (D)

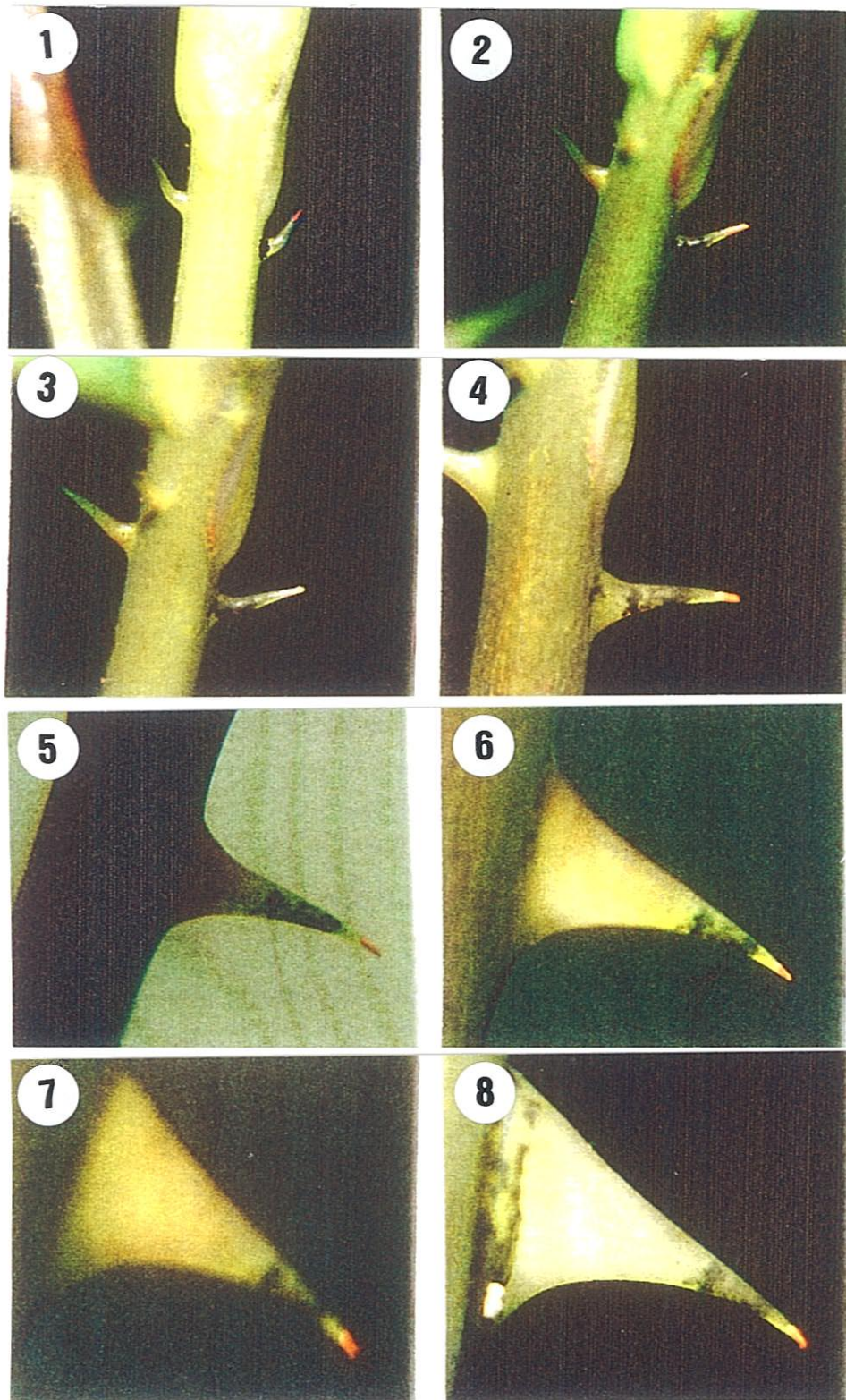


Fig. 5. 4 'Laura' のトゲの伸長の経時的変化

1～8：日数 1日目のトゲの先端を赤，基部を黒ペンキでマークし，その変化を記録した。

3. ‘Laura’ の充分成長したシュート上のprickleとacicle位置の分布と長さ

Fig. 5. 5は成長した‘Laura’のシュートの表皮を平面に展開した場合のprickleとacicleの位置と長さの分布を示した模式図である。トゲの長さは中央部に長いものが多く、上及び下にいくに従って短くなっていた。さらにその分布には葉序のような規則性はなさそうであった。prickleの長さは4.8～11.6 mmであった。acicleの分布はシュートの下部が主で、上部には存在しなかった。その分布には規則性はなく長さもまちまちで0.5～2.5 mmと小さくて短かった。

Fig. 5. 6はHybrid Tea Rose *R. hybrida* ‘Laura’ , ミニローズ *R. x hybrida* cv. ‘Mini Cocktail’ , サンショウのprickleとユズのthornの分布を比較したものである。バラには例外的ではあるが、‘Mini Cocktail’のようにトゲの配列に規則性を持っているものもある。サンショウのトゲは葉序のように規則性があり、葉柄のつけ根のすぐ下に2本のトゲを持っていた。‘Mini Cocktail’も同様に葉柄のつけ根のすぐ下に0～2本のトゲを持っていた。ユズのthornは葉柄のつけ根のすぐ上に1本あり葉序と同じような規則性を持っていた。

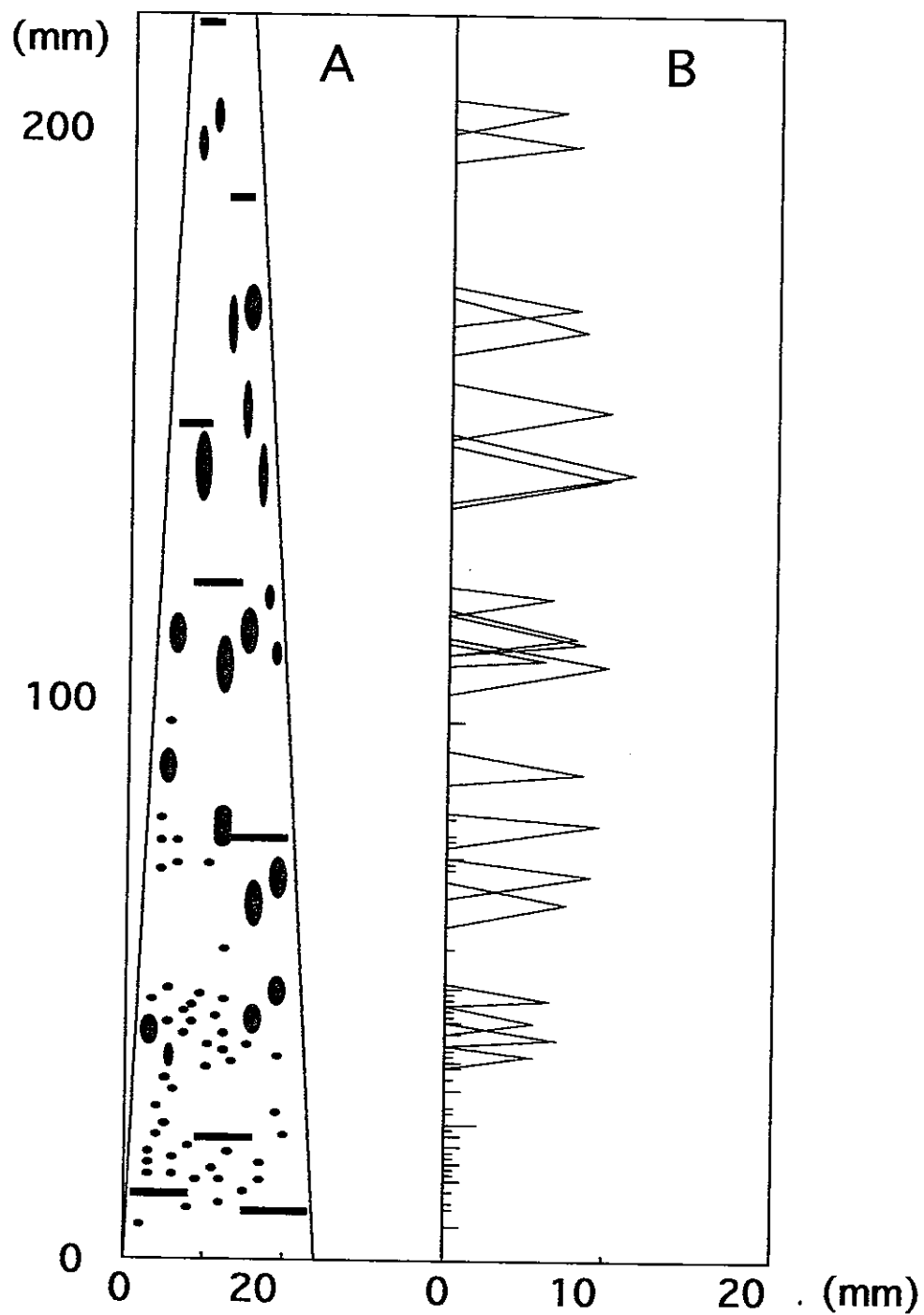



Fig. 5. 5 ‘Laura’ の成長したシュートの表皮を剥ぎ取り平らにした時の
prickleとacicleの位置と長さ及び葉序の位置分布

prickle(● >)とacicle (● —) 葉序()

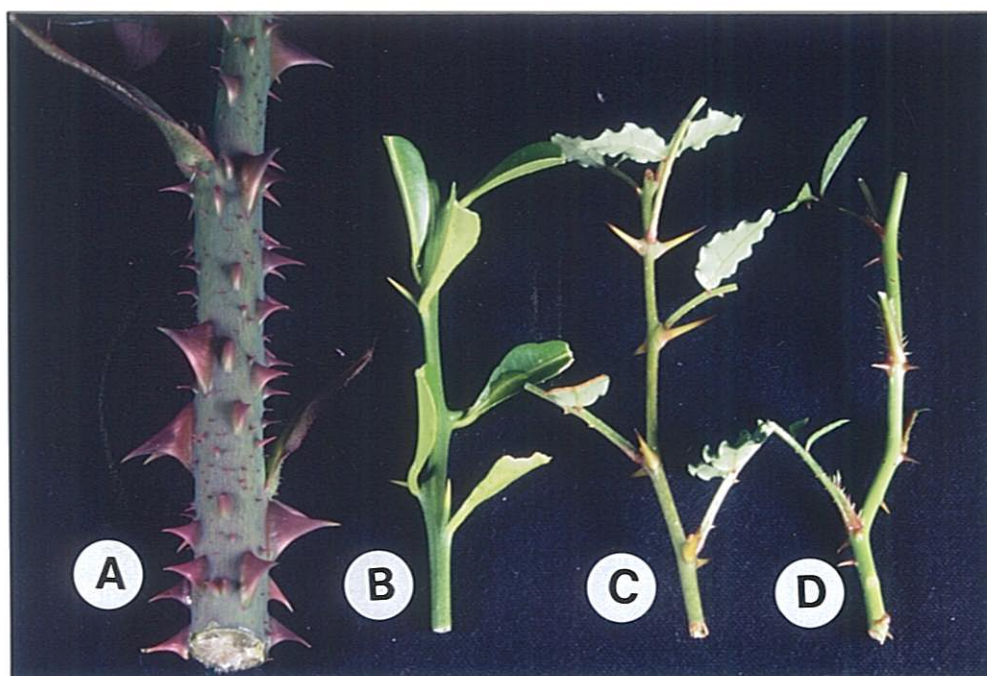


Fig. 5. 6 バラ, サンショウ, ユズのトゲ分布の比較

Hybrid Tea Rose 'Laura' のprickleとacicle (A) ,
 ユズのthorn (B) , サンショウのprickle (C) , ミニローズ
 'Mini Cocktail' のprickle (D)

4. ‘Laura’ , ‘Shortcake’ , サンショウとユズのトゲの組織構造の比較

Fig. 5. 7に ‘Laura’ の葉柄と伸長したトゲの組織の比較を示した。葉柄には維管束があり、葉柄の付け根には維管束と直角に交わる離層様組織が存在した。トゲの縦断面と横断面のいずれにも維管束は認められなかったが、縦断面には落葉樹の葉柄、花、果実のつけ根に見られる離層 (Bucovac, 1971) 様組織が存在することはすでに報告されている (Bracegirdle and Miles, 1973) 。 Fig. 5. 8は

‘Laura’ のトゲの初期段階とまだ柔らかい若いトゲの組織を比較したものである。離層様組織はトゲの初期段階では存在しないが、若くて柔らかいトゲにはすでに存在していた。若いトゲも成長したトゲも手で簡単にこの層から折り取る事ができるだけでなく、触れるだけでトゲが指に刺さる事もよくある。 Fig. 5. 9は

‘Shortcake’ のトゲの縦断面である。離層様組織は ‘Shortcake’ のトゲにも存在した。 Fig. 5. 10 に示すように ‘Laura’ の老いたトゲの離層様組織はサフフラニンで強く染まった。このことはこの層もまた老いた細胞から構成されていることを暗示している。 Fig. 5. 11はサンショウのトゲの縦断面で ‘Laura’ ,

‘Shortcake’ と同様に維管束は認められず、また離層様組織も存在するが、その幅は ‘Laura’ , ‘Shortcake’ に比べてかなり広がった。 Fig. 5. 12にはユズのトゲの縦断面を示したが、 ‘Laura’ , ‘Shortcake’ とは逆に維管束がトゲ組織の内部まで入り込んでおり離層様組織は存在しなかった。

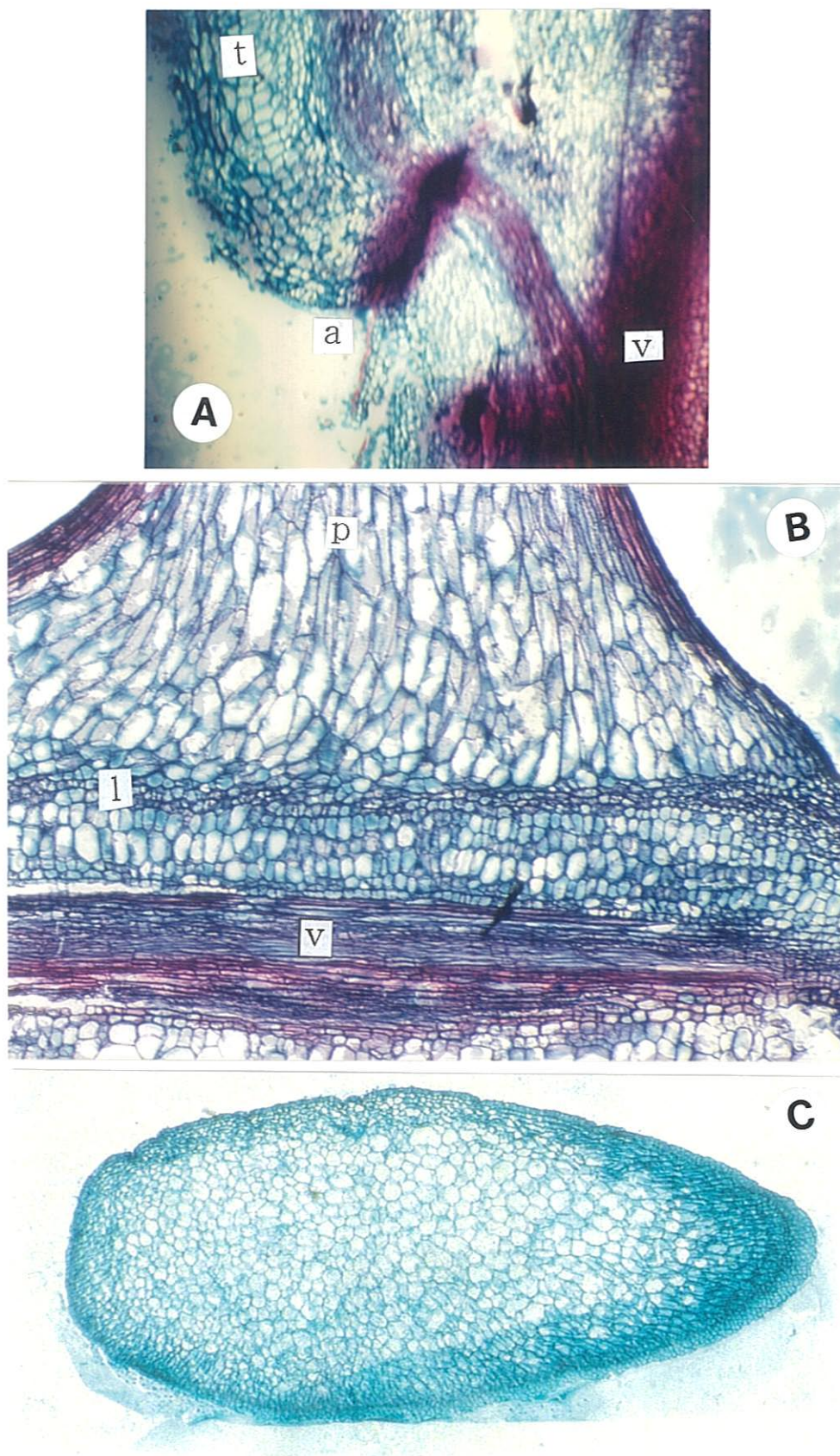


Fig. 5. 7 ‘Laura’ の葉柄のつけ根部分の縦断面組織とトゲの縦断面及び横断面

葉柄の付け根部分の縦断面組織構造 (A) , 葉柄 (t), 離層(a), 維管束 (v),
トゲの縦断面組織構造 (B) prickleの先端方向 (p), 離層様組織 (l),
維管束 (v), トゲの横断面組織構造 (C)

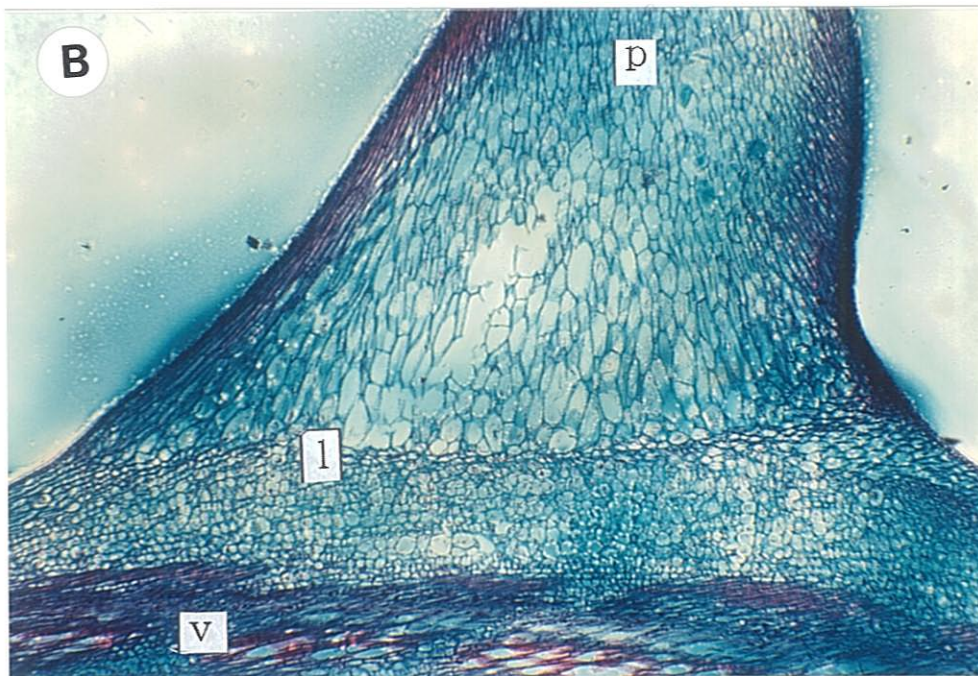
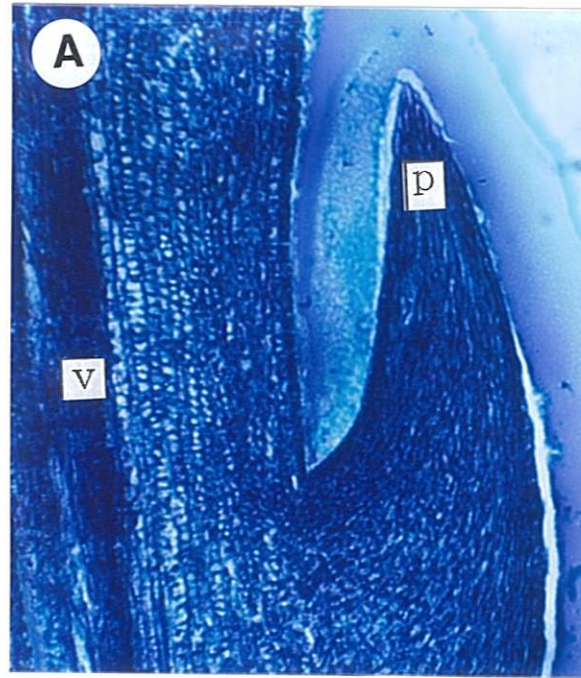


Fig. 5. 8 ‘Laura’ の初期段階トゲとまだ若くて柔らかいトゲの縦断面組織

初期段階のトゲ (A) : prickles(p), 維管束 (v), 若くて柔らかいトゲの縦断面組織構造 (B) : pricklesの先端方向 (p), 離層様組織 (l), 維管束 (v)

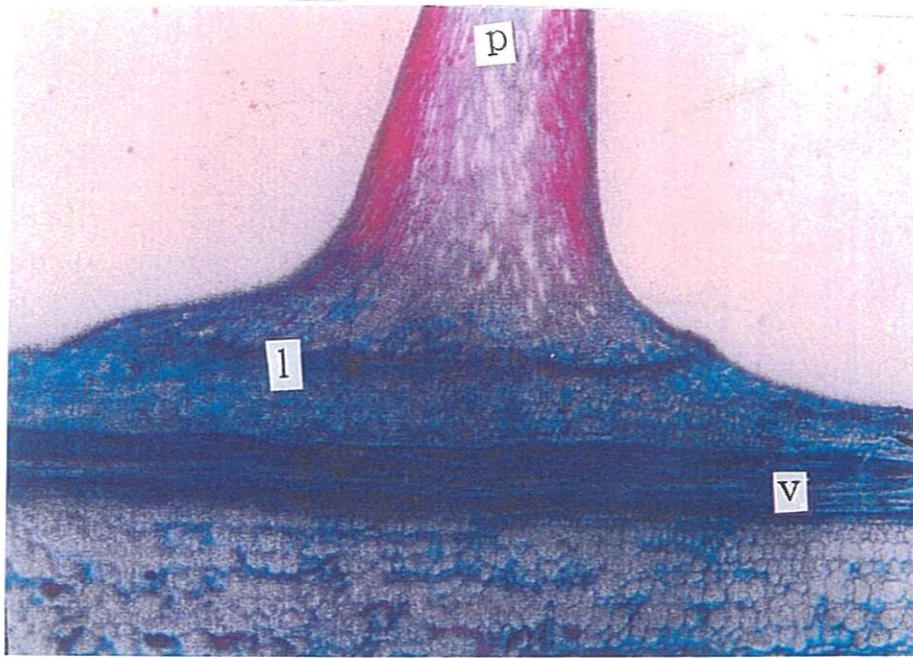


Fig. 5.9 ‘Shortcake’ のトゲの縦断面組織
prickleの先端方向 (p), 離層様組織(l), 維管束 (v)

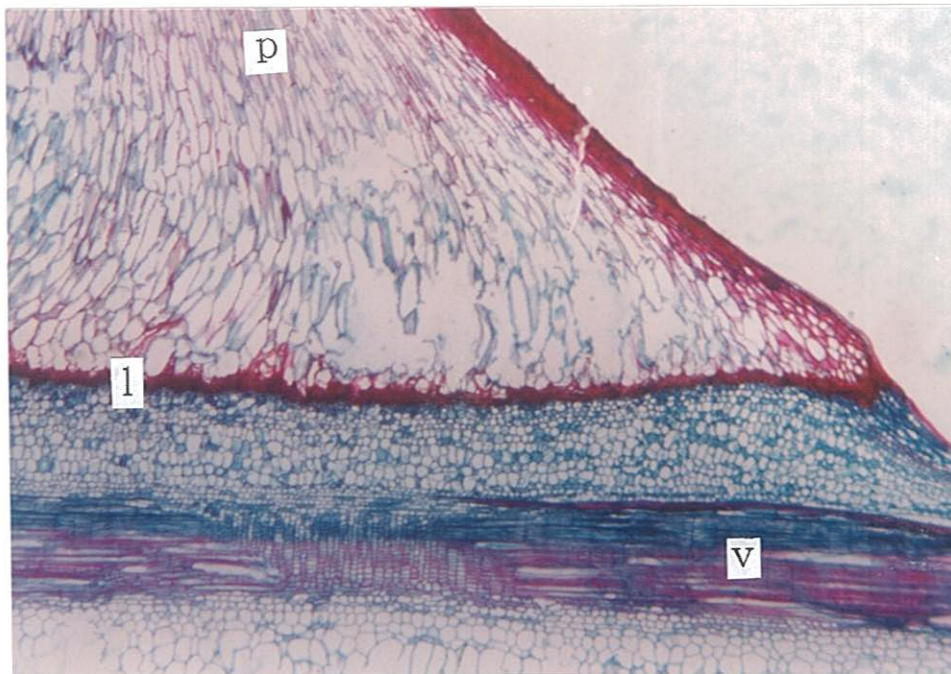


Fig. 5. 10 ‘Laura’ の老いたトゲの縦断面組織
prickleの先端方向 (p), 離層様組織 (l), 維管束 (v)

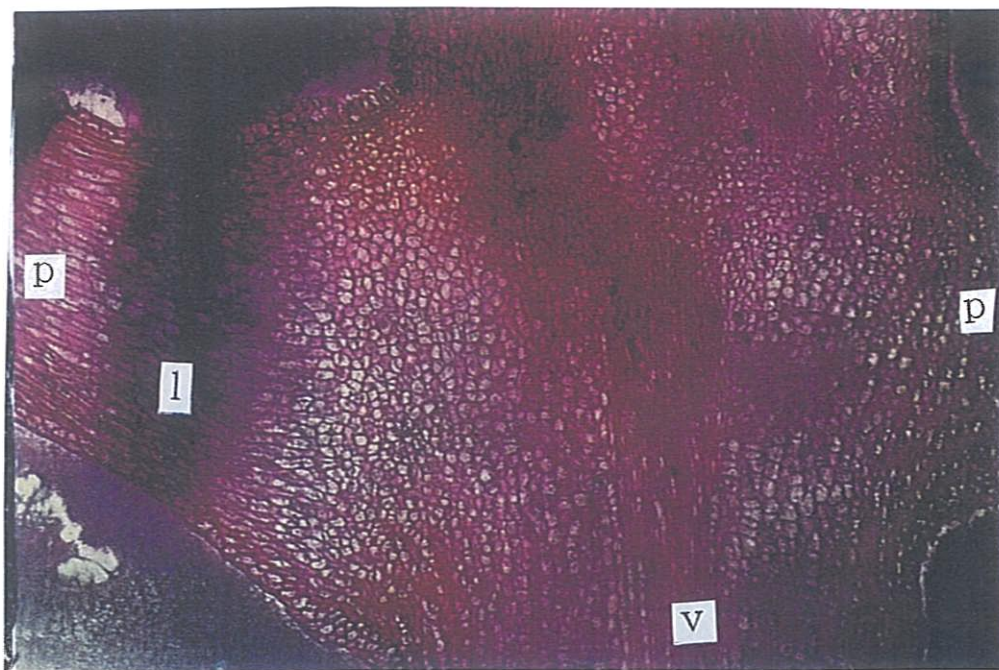


Fig. 5. 11 サンショウの2個で1対になっているトゲの縦断面
prickleの先端方向 (p), 離層様組織 (l), 維管束 (v)

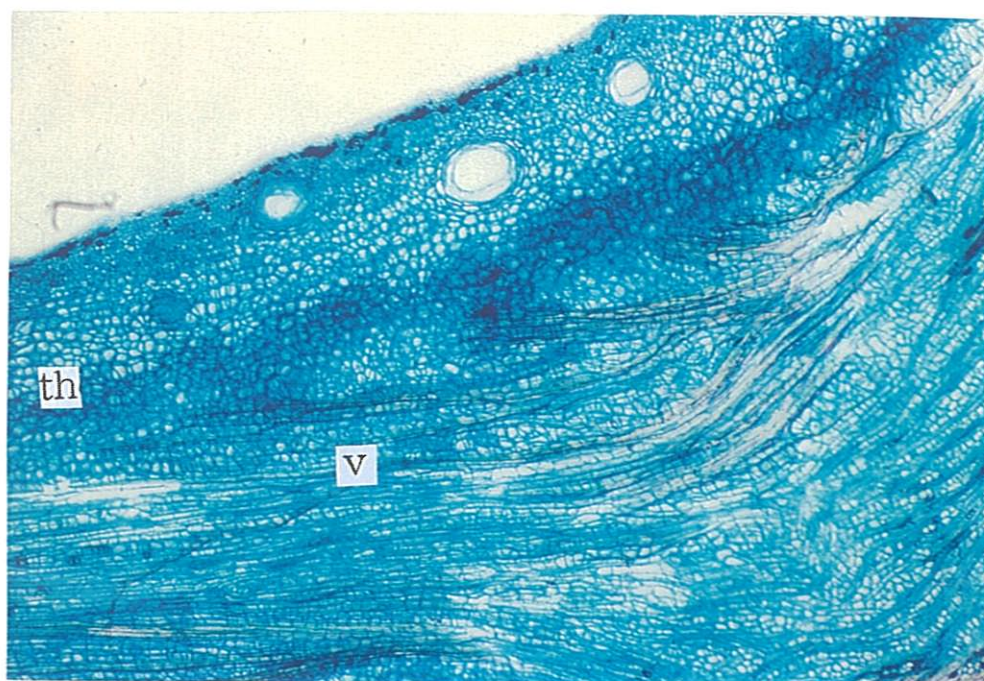


Fig. 5. 12 ユズのトゲの縦断面
thornの先端方向 (th), 維管束 (v)

5. ‘Laura’ のトゲ組織中のリグニンの分布

Fig. 5. 13Aに ‘Laura’ のトゲ組織中のリグニンの分布を示した。柔らかく若いトゲ，固く成熟したトゲ，老化したトゲを手で茎から折り取り，剃刀で縦に半切してphloroglucinolで3時間染色したものである。トゲの成長とともにリグニンはトゲの先端から基部に向かって組織全体に蓄積されているようであった。茎についている古いトゲを同様に茎と共に剃刀で縦に半切してphloroglucinolで30分間常温で染色すると，Fig. 5. 13Bに示すように離層様組織にリグニンの局在が認められた。また柔らかく若いトゲの一部も赤く染色されていたことから，離層様組織にはすでにリグニンの局在が始まっていることがわかった。

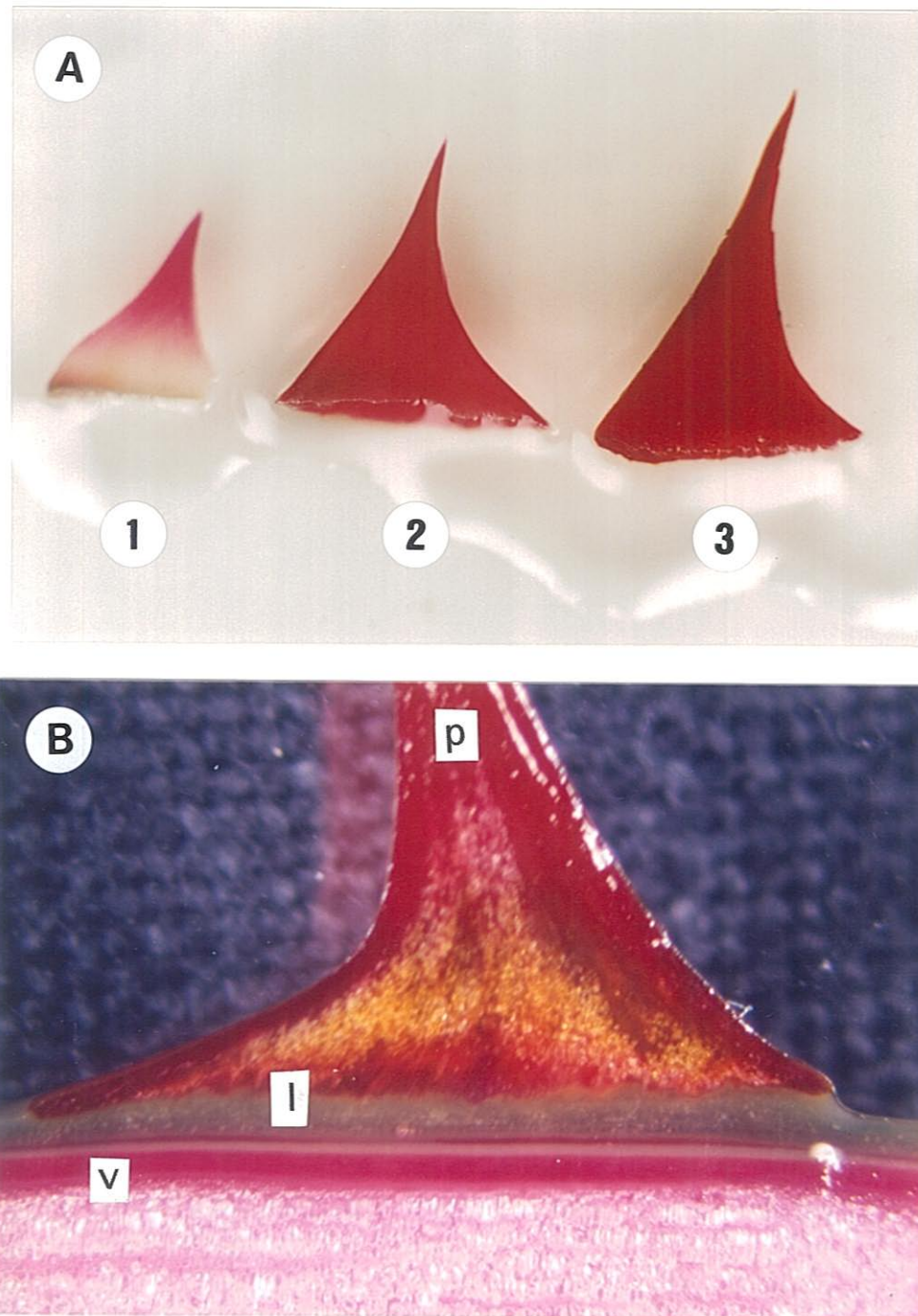


Fig. 5. 13 ‘Laura’ のトゲ組織中のリグニンの分布（赤く染色された部分）

若いトゲ(1), 成熟したトゲ(2), 老化したトゲ(3)を剃刀で縦に半切し,
phloroglucinolで常温で3時間染色 (A). 成熟したトゲを剃刀で縦に半切して
phloroglucinolで常温で30分間染色 (B).
prickleの先端方向 (p) , 離層様組織 (l) , 維管束 (v)

6. まとめ

トゲの発生時期は葉原基の発生とほとんど同じであった。このことはトゲは小枝よりも葉に近いことを示しているが、‘Laura’に関する限りトゲの配列には葉序のような規則性はない。このことは葉との相同性を否定する根拠の一つである。しかし例外的ではあるが、ミニローズ *R. x hybrida* cv. ‘Mini Cocktail’ やサンショウバラ *R. hirtula* (Regel) ‘Nakai’ のトゲの配列はサンショウ *Zanthoxylum piperitum* のトゲの配列と良く似ている。即ち葉柄のつけ根のすぐ下に0～2本のトゲがあり葉序と同じ配列を持っている。

‘Laura’ や ‘Shortcake’ のトゲの組織には維管束がなく外皮組織が変形してできている。したがってトゲの伸長は、そのトゲのある節間の成長に比例しているのは当然であると思われる。すでに良く知られているように落葉樹の葉、花、果実等には離層が存在する。また例外的ではあるが小枝や根にも離層が存在する

(Essau, 1977; Inoh, 1977; Fahn, 1990)。離層様組織の存在が ‘Laura’ や ‘Shortcake’ のトゲでも確認された。‘Laura’ の古いトゲの層はサフラニンで赤く染色されたので、この層はすでに老化した細胞から構成されているものと思われる。

トゲは春に発生して秋には枯死するが、落葉樹の葉のように脱落しない。このことは外敵から身を守るには都合が良いのかも知れない。バラのトゲはサンショウのトゲに良く類似している。サンショウのトゲは維管束を持たないが離層様組織（層の幅はバラより広い）があり、手で簡単に枝から折り取ることができる。しかしユズのトゲはそれらとは異なり、維管束を持ち、手で簡単に枝から折り取ることができない。さらに春に発生したトゲは秋には枯死することなくそのまま成長を続け、離層様組織は存在しない。ユズのトゲは葉よりむしろ小枝に近いといえる。

‘Laura’ のトゲ組織中のリグニンの蓄積はトゲの先端部から始まり基部へと全体に広がって行く。トゲが先端部から次第に固くなって行くことと一致するのは興味深い。離層におけるリグニンの局在もすでに知られている(Poovaiah, 1974)。

‘Laura’ のトゲ組織中の離層様組織にもリグニンの局在が認められた。また切りバラの栽培家の間では、窒素肥料をバラに多く与えると、葉が成長し過ぎるばかりかトゲも大きく成長し、数も増加して花の質が低下する事が経験的に良く知られている。以上のようにバラのトゲの調査結果からは、決定的な証拠ではなく状況証拠だけで、トゲが葉と小枝のいずれに相同的かを結論づけるのは困難であるが、バラのトゲはユズのトゲのように小枝に近いものではなく、どちらかと言えば葉に近いものではないかと考えられる。

第 6 章

バラのトゲに特異的な蛋白質の解析

第1節 緒言

トゲの形成あるいは硬化に必須の蛋白質を見出し、単離・精製してそのアミノ酸配列を決定することができれば、その蛋白質をコードする遺伝子の推定が可能となり、トゲ形成や硬化に必須の蛋白質を作る遺伝子の単離を試みることができる。次に、例えばアンチセンス遺伝子をバラのIEGCに導入して形質転換体の再生を行えば、トゲなしバラあるいは柔らかいトゲを持つバラの作出も不可能ではないと考えられる。しかしながらトゲの蛋白質についての文献もデータも全く報告されていないので、とりあえずトゲ、葉、茎の皮層、芯（皮層を除いた茎）組織から蛋白質を抽出してSDS-PAGEと二次元電気泳動(II-D)を行い、それらを比較することでトゲに特異的な蛋白質を見出すことにした。

第2節 材料と方法

1. 材料

Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' と Miniature rose *R. x hybrida* cv. 'Shortcake' の若いシュートから採取したトゲ、葉、皮層、芯（皮層を除いた茎）組織を用いた。

2. 蛋白質の抽出

上記の材料からの蛋白質の抽出は以下の手順で行った。新鮮重1～3gの試料を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒で充分細かく粉碎した。試料の3～5倍の蛋白質抽出緩衝液（0.7M sucrose, 0.5M Tris-HCl, 0.1M KCl, 0.05M Na₂-EDTA; pH 7.5）と2%のME（メルカプトエタノール）を加え攪拌した。40 mlのファルコンチューブに移し、10,000gで5分間遠心し、上清に等量の水飽和フェノールを加え激しく攪拌し、さらにVortexした。5,000gで5分間遠心し、ピペットで二層に分離した上層部を新しい40 mlファルコンチューブに移した。これに等量の蛋白質抽出緩衝液を加え激しく攪拌しさらにVortexした。5,000gで5分間遠心し、パスツールピペットで二層に分離した上層部を新しい40 mlファルコンチューブに移した。4倍量の沈澱緩衝液（0.1M ammonium acetate in MeOH）を加え激しく攪拌しさらにVortexして、-20℃で一昼夜静置した。10,000gで5分間遠心し、上清を捨てた。

キムワイパー上にチューブを逆さに立て、5～10分間乾燥して-80℃で保存した。

3. 試料の蛋白質濃度の測定

-80℃で保存していた試料にサンプルバッファー[DW 4.8ml, 0.5M Tris-HCl(pH 6.8) 1.2ml, Glycerol 1.0ml, 10% (w/v) SDS 2.0ml] 200-1000 μ l を加えてvortex及び超音波処理で完全に溶解した。Protein Assay (BioRad) 0.8ml, DW 3.2ml にサンプルバッファー 10 μ l を入れてvortexしたものを2本と同様に蛋白質を溶解したサンプル 10 μ l を入れてvortexしたものを1本準備した。測定用の2個の石英ガラスセルに最初の2本を注入し、分光分析計（日立, 2000A 測定波長 595nm）を用いて2本の吸光度のゼロバランスを取った。次に2本のうちの1本を後の1本と入れ替えることで蛋白質を溶解したサンプルの吸光度を測定し、予め作成した吸光度と蛋白質濃度の検量線からサンプル中の蛋白質濃度を求めた。

4. SDS-PAGE

常法により、濃縮ゲルのアクリルアミド濃度4.5%，分離ゲルのアクリルアミド濃度15%のゲルを作成した。

サンプルバッファーに溶解した各種蛋白質20 μ gを熱変性したものと、分子量マーカー（BIO-RAD, Low Range）をサンプル孔に注入した。通電プログラム、70V \times 1hr + 120V \times 2hr + 220V \times 2hrで電気泳動を行った。

5. ゲルの染色・脱染及び記録方法

電気泳動後のゲルを染色液（0.1% CBB-R250, 25% エタノール, 8% 酢酸）を入れたバットに入れ、攪拌しながら染色した。脱染後、デジタルカメラでゲルを撮影した。

6. II-D (O'Farrell, 1975)

6. 1. 1次元目の等電点電気泳動

約6.2%のアクリルアミドとAmpholine (pH 3-10) 及びAmpholine (pH 5-7) を用いてディスクゲルを作成した。蛋白質量250 μ gの試料をゲル上に注入した。pH マーカーは、IEF Standards(pl 4.45-9.6, Bio-Rad)を用いた。等電点電気泳動は、通電プログラム200V \times 2hr + 600V \times 14hr + 1,000V \times 1hrで行った。1次元目電気泳動後のゲルはSDS存在下のバッファー中で15分間の熱変性を2回繰り返した

6. 2. 2次元目SDS-PAGE

4.5%アクリルアミド濃度の濃縮ゲルと15%アクリルアミド濃度のSDS-PAGE用分離ゲルを用い、通電プログラム70V \times 1hr + 120V \times 2hr + 220V \times 3hrで電気泳動を行った。

第3節 結果と考察

1. Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura'

1. 1. トゲ, 葉, 皮層, 芯(皮層を除いた茎)組織の蛋白質のSDS-PAGE

Fig. 6. 1 は 'Laura' のトゲ, 葉, 皮層, 芯(皮層を除いた茎)組織各1gから蛋白質を抽出しそれぞれ20 μ gをSDS-PAGEを行って, CBB-R250で染色した結果である。31.0kDaと45.0kDaの間にトゲに特異的なバンドが少なくとも4本認められるが, Fig. 6. 1ではバンド幅が拡散してはっきりしなかったのでトゲを半切して先端部と基部に分け, それぞれから蛋白質を抽出して上記と同様にSDS-PAGEを行った結果をFig. 6. 2に示した。先端部のレーンにa, b, c, dで示した4本のバンドがトゲに特異的なポリペプチドであることが明らかになった。ポリペプチドa, b, c, dの大きさはそれぞれ40.3, 38.7, 37.4, 33.5 kDaであった。

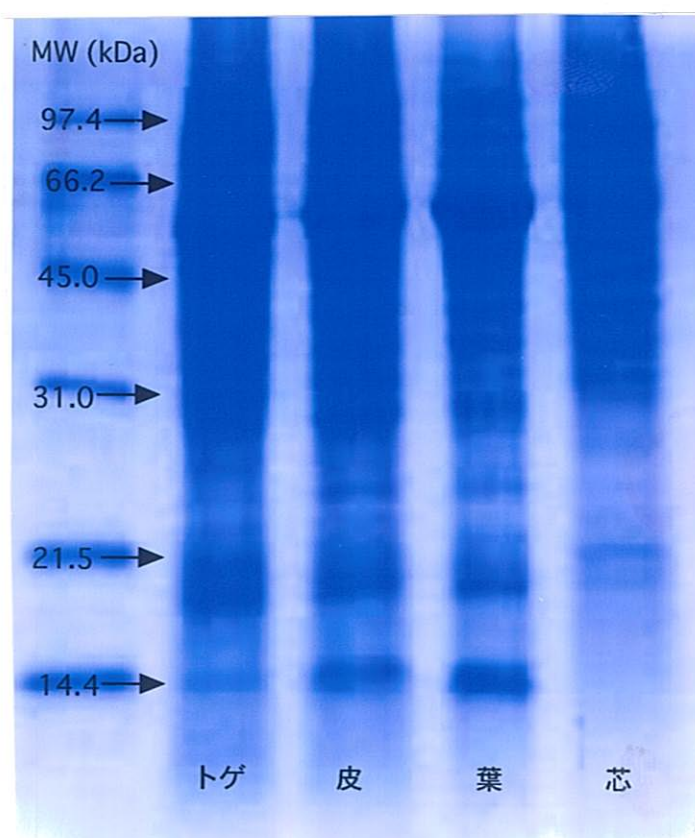


Fig. 6.1 Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' のトゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織から抽出した蛋白質のSDS-PAGEパターン

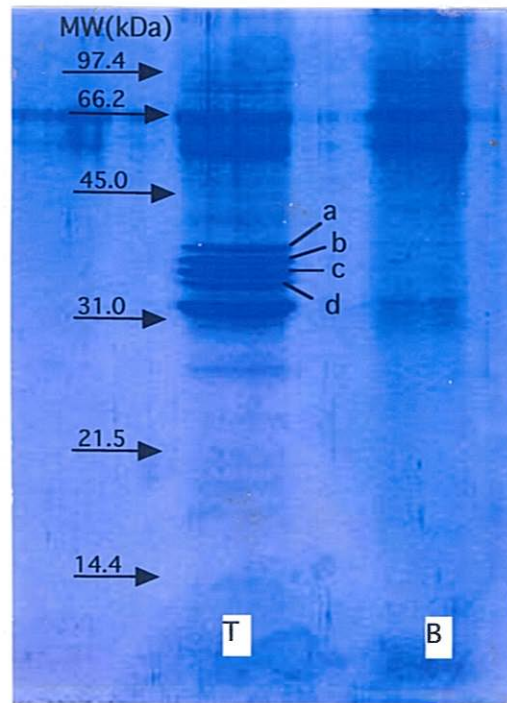


Fig. 6. 2 Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' のトゲ先端部 (T) と基部 (B) 組織から抽出した蛋白質のSDS-PAGEパターン

1. 2. トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織の蛋白質のII-D

トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織それぞれ約3gから蛋白質を抽出し, 蛋白質量約250 μ gを用いてII-Dを行った. その結果を Fig. 6. 3に示した. Fig. 6. 3A, B, C, D を比較すると, ポリペプチドのスポットが陰極側に多く, 陽極側に少ないことがめだつ. Fig. 6. 3Aに示したすトゲのII-Dのスポットaとbはトゲに特異的なスポットと思われる. この二つの ポリペプチドの分子量とpI値は下記の通りであった. 以後この二つのスポットに注目しながら実験を進めることにした.

Table 6. 1 Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' のトゲに特異的なポリペプチドのスポット

ポリペプチド	分子量 (kDa)	pI
a	37.1	5.3
b	31.9	5.4

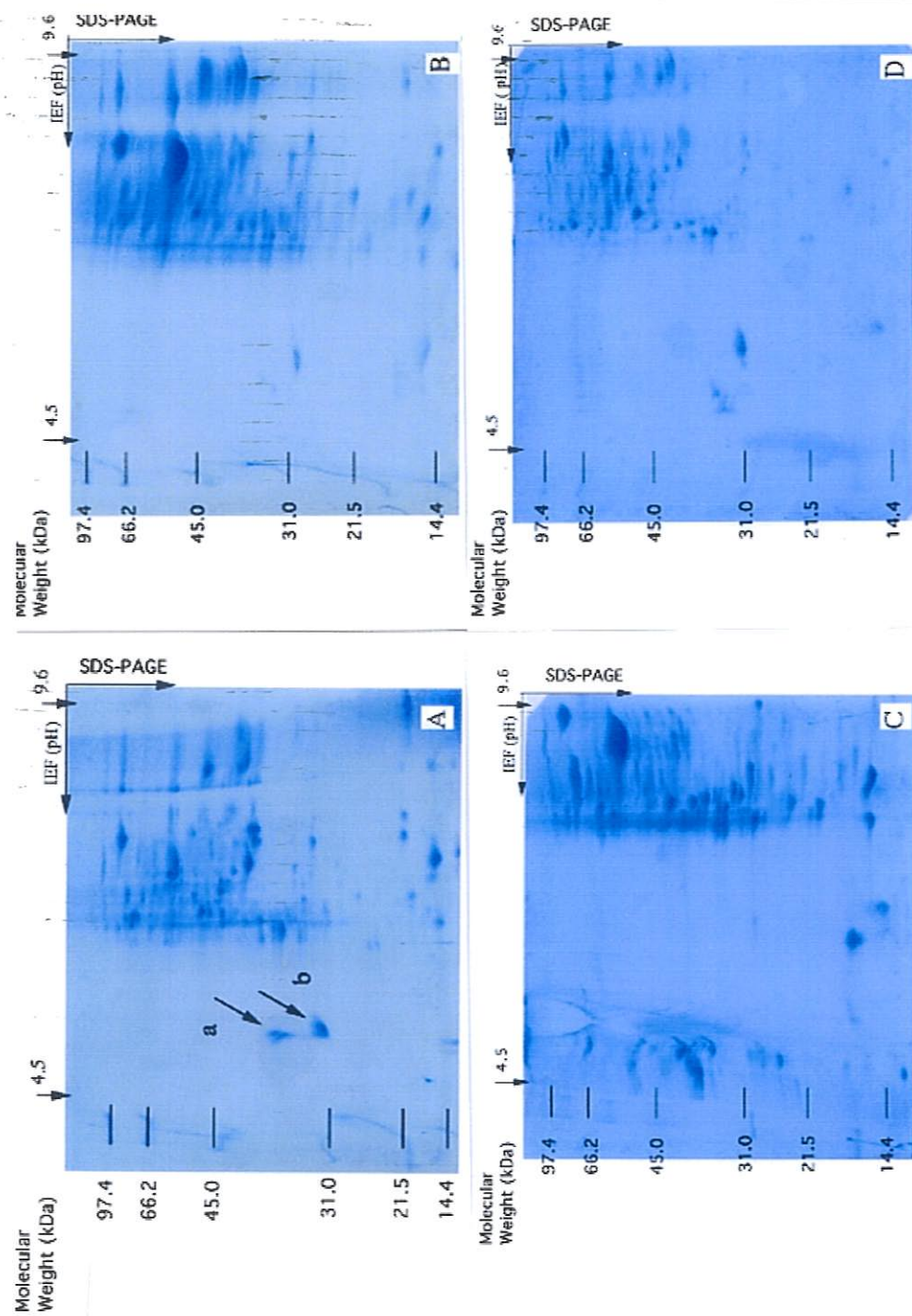


Fig. 6.3 Hybrid Tea Rose *R. hybrida* cv. 'Laura' の
トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織組織から抽出した蛋白質のII-Dパターン
A: トゲ, B: 皮層, C: 葉, D: 芯 (皮層を除いた茎)

2. ミニローズ *R. X hybrida* cv. 'Shortcake'

2. 1. トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織から抽出した蛋白質のSDS-PAGE

Fig. 6. 4は 'Shortcake' のトゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織各 1 g から蛋白質を抽出し, それぞれ20 μ gを用いてSDS-PAGEを行い, CBB-R250で染色した結果である.

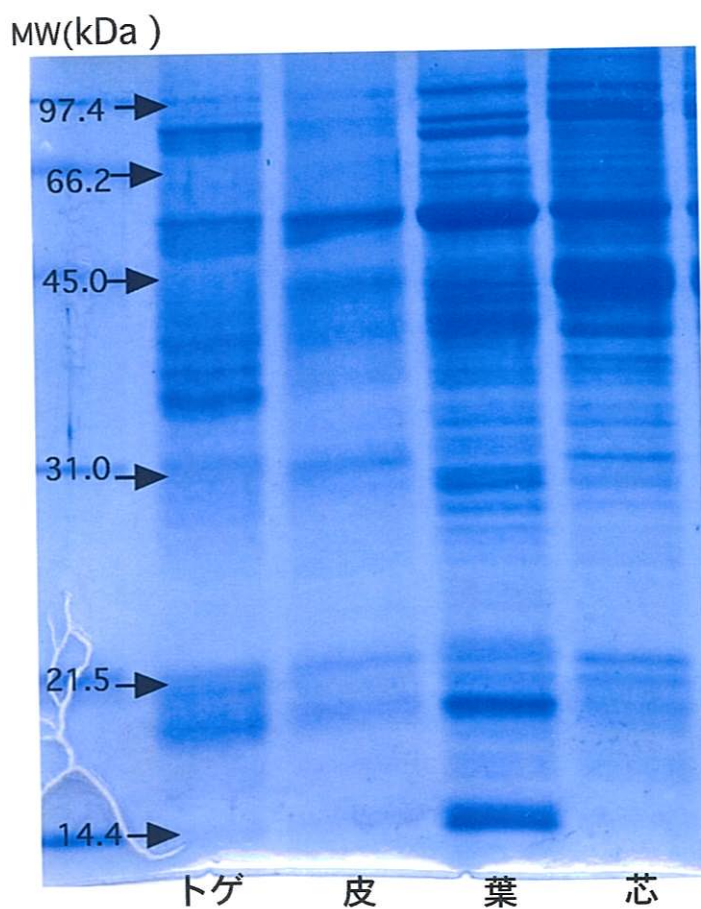


Fig. 6. 4 Miniature rose *R. X hybrida* cv. 'Shortcake' トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織から抽出した蛋白質のSDS-PAGEパターン

2. 2. トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織から抽出した蛋白質のII-D

トゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織それぞれ約3gから蛋白質を抽出して蛋白質量約250 μ gを用い, II-Dを行った. その結果を Fig. 6. 5に示した. Fig. 6. 5A, B, C, D を比較すると, ポリペプチドのスポットが陰極側に多く, 陽極側に少ないことがめだつ. さらにFig. 6. 5A中に示すスポットaとbはトゲに特異的なスポットと思われる. ポリペプチドa, bの分子量とpI値は下記の通りであった.

Table 6. 2 Miniature rose *R. X hybrida* cv. 'Shortcake' のトゲに特異的なポリペプチドのスポット

ポリペプチド	分子量 (kDa)	pI
a	35.7	4.7
b	31.7	5.6

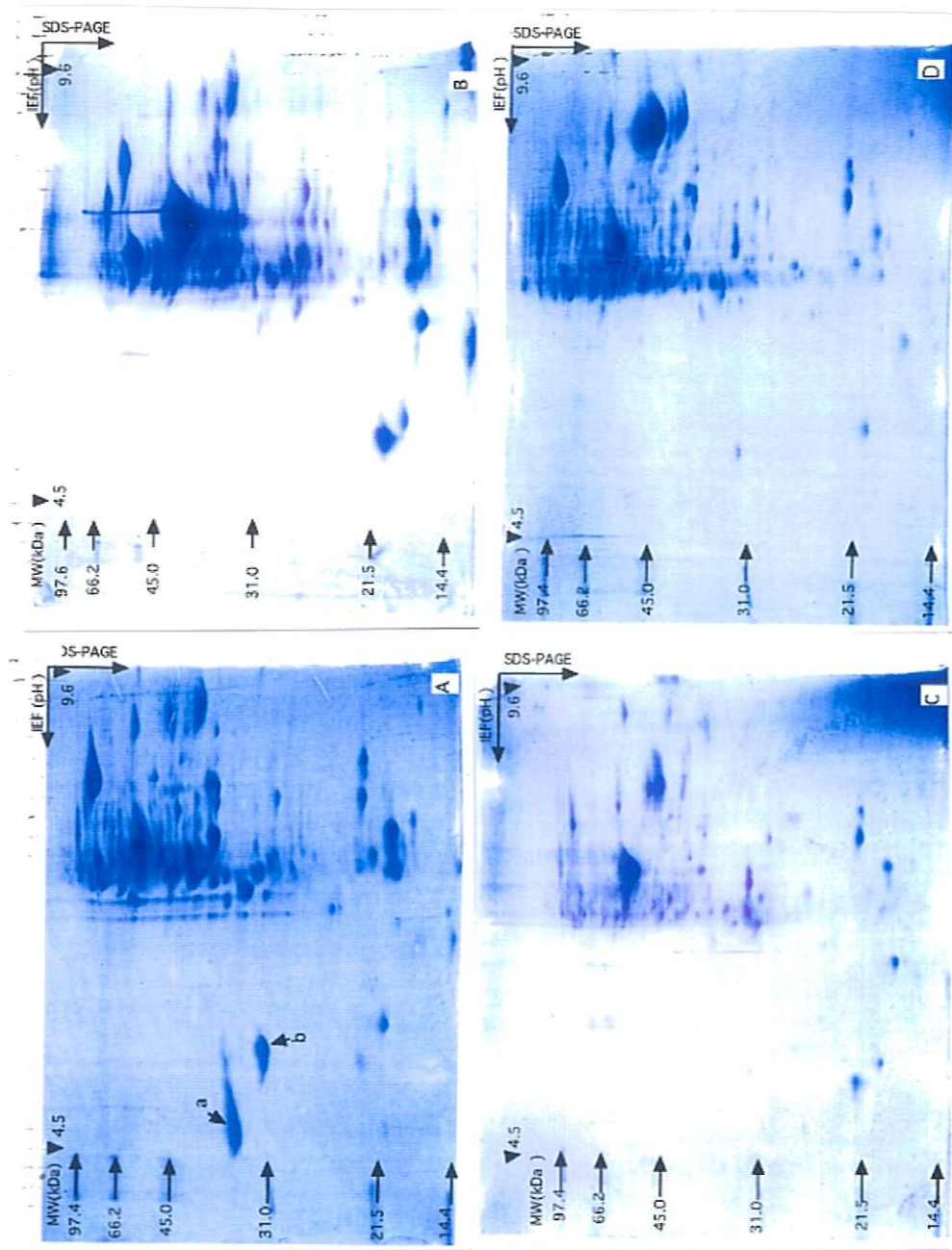


Fig. 6. 5 Miniature rose *R. X hybrida* cv. 'Shortcake' のトゲ, 葉, 皮層, 芯 (皮層を除いた茎) 組織から抽出した蛋白質のII-Dパターン
A: トゲ, B: 皮, C: 葉, D: 芯

総 括

5種類のバラ (Hybrid Tea Rose 3種類 *R. hybrida* cv. 'Laura', 'Mächenkönigin', 'Golden Heart' と Miniature rose 1種類 *R. x hybrida* 'Orange Rosamini' それに Floribanda Rose 1種類 *R. hybrida* cv. 'Teneke') の葉の外植片からOC形成が認められたが、OCからの不定芽誘導率はバラの種類やホルモンに大きく左右された。また24区のホルモン設定区での不定芽形成率はいずれも13%以下で、かつ再現性も高くなかった。

不定芽誘導率の最も良好であった 'Teneke' のOCを用いて *Agrobacterium* LBA4404/ pBI121-35S-GUS 仲介法により、GUS遺伝子を導入して形質転換植物体の再生を試みた。しかし菌と共存培養した80片のOCをクラフォランとカナマイシンを含む選抜MS培地で選抜培養した結果、生き残ったのは僅かに2片 (2.5%) であった。この2片のOCを半切してGUS検定した結果はいずれもGUS (+) であった。残りの半切したOCを増殖させて形質転換植物体の再生を試みたが、結果的に不定芽の誘導は出来なかった。その原因は明らかでないが、滅菌に用いたクラフォラン、選抜の為のカナマイシン、更にゲノムに組み込まれたT-DNA等が、再生能力を低下させた可能性が考えられる。 'Teneke' のOCからの形質転換植物体の再生を断念した。次に Miniature rose 'Shortcake' の自家受粉で得られた未熟種子由来のIEGCからの植物体再生を行った。未熟種子からのIEGCの誘導率は高々5%であったが、シュートの再生能力は極めて高くIEGC1片 (新鮮重量 = 約3g/片) 当たりのシュート数は平均7.7本であった。 'Laura' の葉外植片由来のOCからの再生植物体には変異は認められなかったが 'Shortcake' の自家受粉で得られた未熟種子由来のIEGCからの再生植物体には花弁数の減少や、単葉の形状変化 (楕円状から丸みをおびた円状に変形)、とげの数の減少等の変異が認められた。

光学顕微鏡による染色体の直接観察やPloidy Analyzerによる染色体数の比較調査の結果は、これらの変異は染色体数の変化によるものではなく、オリジナル植物も再生植物体も共に4倍体である事が明らかになった。

一方RAPD分析の結果は少なくとも4種類のプライマーについて、オリジナル植物と再生植物体のDNAパターンに明確な相違が存在する事が明らかになった。従ってこれらの変異はゲノムのDNA配列の僅かな違いによるものであると思われる。

再生能力の極めて高いIEGC再生系を確立したので次のステップとして

'Shortcake' のIEGCに *Agrobacterium* EHA101/ pHTS-35S-GUS 仲介法によりGUS遺伝子を導入し、形質転換植物体の再生を行った。IEGCの菌との共存培養後のGUS検定の結果は共存培養液の菌濃度によりあまり左右されず、35~55%の高い比率で

GUS (+) であった。またSAATも超音波を3秒加える事でわずか5%の向上が認められたにすぎなかった。

1 mg/l BAを含む選抜再生MS培地によるシュート発生率は1.46本/IEGC (新鮮重量 = 約3g/片) とかなり高い数値を示したが、非形質転換IEGCの7.7本/IEGCに比較すると1/5以下であった。これはハイグロマイシンやゲノムに組み込まれたT-DNA等が再生能力を低下させたためと考えられる。しかし1 mg/l BAと0.1mg/l NAAを組み合わせた選抜再生MS培地では3.16本/IEGCに向上させることができた。

形質転換体と思われる65本のシュートから最終的に7本の小植物体を得る事に成功した。これら7本の小植物体は隔離温室の土壌で順調に成長し、1年半の間に春と秋の2回花を咲かせた。最初のシュートの花はオリジナル植物体の花とは全く形状が異なっていたが、2番目以降のシュートの花は全て同じような花で、しかも非形質転換IEGCからの再生植物体の花と酷似していた。この理由は明らかではないがPloidy Analyzerで調べた結果は、形質転換植物体もオリジナル植物体と同様に4倍体である事が判明した。従ってこの原因は染色体数の変化によるものではないと思われる。

形質転換体と思われる再生植物体の各器官についてGUS検定を行った結果、雌蕊の柱頭には強い一過性のGUS遺伝子の発現が認められたのに対して、花卉には全く反応が認められなかった。同様に茎や根には強く青色の発色があったのに、葉にはぼやけたうすい青色の発色しか認められなかったのでキメラではないかと思われた。しかし任意に選んだ20枚の花弁と単葉からカルスを誘導してGUS検定を行ったところ、すべてに強い一過性のGUS遺伝子の発現が認められたのでキメラではないことが明らかになった。形質転換体と思われる再生植物体の葉にカミソリの刃で切り込みを入れてからGUS検定を行うと、切り込みの両側の0.2-0.5mmのごく狭い範囲しか青色に発色しない。このことはX-GLUCは葉由来のカルスの細胞内には良く浸透するが葉組織の細胞内には浸透しにくい事を示唆している。すなわちGUS検定で葉にはぼやけたうすい青色の発色しか認められなかったのは、葉の組織内では一過性のGUS遺伝子の発現があるにも拘わらず、X-GLUCの細胞内への浸透がほとんどなかったため青色の発色が殆ど認められなかったものと思われる。

また7本の形質転換体と思われる再生植物体とオリジナル植物体について、GUS遺伝子のフラグメント (430 bp) をプローブとして行ったPCR-サザンハイブリダイゼーションの結果もまた、オリジナル植物体以外は全てGUS (+) であった。更にHPT- RNA (約1 kbp) をプローブとして、5本の形質転換体と思われる再生植物体とオリジナル植物体について行ったサザンハイブリダイゼーションの結果

は、5本とも同じDNAパターンを示した。この事は形質転換IEGC組織の1個の細胞から5本の形質転換植物体が再生した事を示唆しており、これらは互いにクローンであると思われる。以上のことからT-DNAは形質転換再生植物体ゲノム中に組み込まれていると考えられる。

トゲの組織と形態の調査からトゲには維管束はなく、落葉樹の葉の離層に似た層があり、その層から簡単に手で折り取る事ができる。例外的に葉序のような規則的な配列のトゲを持つバラもあるが、‘Laura’のトゲの配列について、皮を剥ぎ取って調べたが規則性は認められなかった。さらに数多くのバラのトゲの配列について観察したが殆どのバラのトゲの配列に一見して判るような規則性はなかった。

トゲの発生は葉原基と殆ど同時期であり、形状も丸く柔らかであった。特にacickleの先端は平らで全体はマッシュルーム状であった。またトゲは春に葉と同時に発生し、秋には枯死するが葉のように脱落はしない。

一方ユズのトゲはバラのトゲとは対照的で葉序のように配列に規則性はあるが、維管束を持ち、また離層のような層はなく簡単に手で折り取ることはできない。また春に発生したトゲはバラのトゲのように、秋に枯死する事なく枝と共に成長を続ける。このようなことからだけでは結論できないが、ユズのトゲは葉よりは小枝に似ており、バラのトゲは小枝よりもむしろ葉に近いと考えられる。

トゲの形成または硬化に必須の蛋白質を見出すために‘Laura’と‘Shortcake’のトゲ、茎の皮層、葉、芯（皮層を除去した茎）組織から抽出した蛋白質のII-Dを行った。その結果を比較する事で‘Laura’と‘Shortcake’の両方で下記に示すような、トゲに特異的でかつよく類似した二つのポリペプチドを見出す事ができた。

バラ	ポリペプチド	分子量 (kDa)	pI
‘Laura’	a	37.1	5.3
	b	31.9	5.4
‘Shortcake’	a	35.7	4.7
	b	31.7	5.6

II-Dの結果は、ほとんどのポリペプチドのスポットが陰極側に偏っているのに対して‘Laura’、‘Shortcake’のポリペプチドaとbは陽極側に存在しており、かつ

分子量の大きさも同程度である事は興味深い。しかし現段階ではこれらのポリペプチドがトゲに関してどのような働きをするのかは全く不明である。

謝 辞

クリーンベンチの使用方法から御指導下さった谷本静史教授(佐賀大学農学部)に深く感謝します。貴重な助言を下さった加藤富民雄教授(佐賀大学農学部), 衛藤威臣教授(鹿児島大学農学部), 及び仁藤伸昌教授(近畿大学生命理工学部)に厚く感謝します。生物工学的技術を御指導下さった國武久登助教授(宮崎大学農学部), 穴井豊明助教授(佐賀大学農学部), 大薮榮興室長(佐賀県農業研究センターバイオテクノロジー部花き・果樹育種研究室), 本研究に協力して下さいったDr. A. Asadi Abkenar, 古賀農人君, 久保了子さん, 小宮ひとみさん, 佐藤由佳さん(佐賀大学農学部)の皆さんに感謝します。

引用文献

- Asano, G. & S. Tanimoto, (2002) Plant regeneration from embryogenic calli derived from immature seeds in miniature rose cultivar 'Shortcake' ; Somaclonal variation, cytological study and RAPD analysis. *Plant Biotechnol.* 19: 271- 275.
- Asano, G. & S. Tanimoto, (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation and transgenic plant regeneration from embryogenic calli derived from an immature seed produced from miniature rose cultivar 'Shortcake' . *Plant Biotechnol.* 20: 291-296
- Arisumi, K. (1968) Studies on the flower colors in *Rosa*, with special references to the biochemical and genetic analyses and to the application of those results to the practical breeding. VI *Bull. Fac. Agr. Yamaguchi Univ.* 19:1173-1181
- Bell, A. D. (1991) *Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology.* Oxford University Press, New York.
- Bracegirdle, B. and P.H. Miles, (1973) *An Atlas of Plant Structure* Vol. 2 Heinemann Educational Book Ltd. London
- Brandt, S., (1970) *Statistical and computational methods in data analysis.* North-Holland publishing company Amsterdam. London
- Bukovac, M. J. (1971) The nature and chemical promotion of abscission in maturing cherry fruit. *HortScience* 6: 33-36.
- Burger, D. W., L. Liu, K. W. Zary, C. I. Lee (1990) Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 21: 147-152.
- Chuck, G., T. Robbins, C. Nijjar, E. Ralston and N. Countney-Gutterson, and H. K. Dooner (1993) Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element *Activator*. *Plant Cell* 5: 371-378

- Curtis, L. S., J. B. Power, P. Hedden, D. A. Ward, A. Phillips. K. C. Lowe, M. R. Davey (1999) A stable transformation system for the ornamental plant, *Datura meteloids* D. C. Plant Cell Rep. 18: 554-560
- Darling, C. D., L. F. Cour (1960) The Handling of Chromosomes. London Allen and Unwin Ltd.
- de Wit, J. C., H. F. Esendam, J. J. Honkanen, and U. Tuominen (1990) Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose. Plant Cell Rep. 9: 456-458
- Dubois, L. A. M., D. P. de Vries (1996) The direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of glasshouse-grown cut rose cultivars. Acta Hort. 424: 327-331
- Essau, K. (1977) Anatomy of Seed Plants 2nd ed. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Fahn, A. (1990) Plant Anatomy 4th ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fire, A., SiQ. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver & C. C. Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811
- Firoozabady, E., Y. Moy, N. Courtney-Gutterson, H. Fukui and K. Imaida (1996) Somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* L. cv. 'Barkaloe' . Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. 61: 25-30
- Fukuda-Tanaka, S., Y. Inagaki, T. Yamaguchi, N. Saito and S. Iida (2000) Colour-enhancing protein in blue petals. Nature 407: 581
- Fukui, H., and K. Imaida (1996) Somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* L. cv. Barkaloe. Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. 61: 25-30
- Fukui, Y, Y. Tanaka, T. Kusumi, T. Iwasita, K. Nomoto (2003) A rationale for the shift in colours towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene Phytochem. 63:15-23
- 藤岡 友宏 (1985) ばら 保育社
- Gillam, E. N. J, F. P. Guengerich (2001) Exploiting the versatility of

- human cytochrome P450 enzyme: The promise of blue rose from biotechnology. IUBNB Life 52 : 271-277
- Gutterson, N. (1995) Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression HortScience 30: 964-966
- 原 襄. (1981) 植物のかたち. 培風館
- Hasegawa, P. M. (1980) Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 215-220.
- Hickey, M. and C. King, (2000) Illustrated Glossary of Botanical Terms. Cambridge University Press, Cambridge.
- Holford, P., N. Hernandez, and H. J. Newbury (1992) Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 11:196-199
- Holton, T. A., F. Brugllera, D. R. Lester, Y. Tanaka, C.D. Hyland, J. G. T. Menting, C.-Y. Lu, E. Farcy, T. W. Stevenson and E. C. Cornish (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. Nature 366: 276-278
- 星野 敦、森田裕将、飯田 滋 (2002) 花を彩る遺伝子 蛋白質 核酸 酵素 vol.43 no.3 特集 (植物色素の生化学と遺伝学) 共立出版
- 猪野 俊平. (1977) 植物組織学. 内田老鶴園新社
- Ishioka, N., S. Tanimoto (1990) Plant regeneration from Bulgarian rose callus. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 22:197-199
- Jacobs, G., C. H. Bornman, and P. Allan (1968) Tissue culture studies on rose. Use of pith explants. S. Afr. J. Agric. Sci. 11: 673-678
- Jefferson, R. A., (1987) Assaying chimeric genes in plants; the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, M. W., Bevan (1987) GUS fusion: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.
- Kintzios, S., C. Manos, O. Makri (1999) Somatic embryogenesis from

- mature leaves of (*Rosa* sp.). Plant Cell Rep. 18: 467-472
- Konkel, D. A. and V. M. Ingram (1978) Is there specific transcription from isolated chromatin. Nucleic Acids Res. 5:1237
- Kunitake, H., H. Imamizo, M. Mii (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.). Plant Sci. 90: 187-194.
- Lawson, M. (1991) Australian company near to rose. Nature 352: 653
- Lloyd, D., A. V. Roberts, and K. C. Short (1988) The induction *in vitro* of adventitious shoots in *Rosa* . Euphytica 37: 31-36
- Ma, Y., M.N. Islam-FariDi, C.F. Crane, D.M. Stelly, H.J. Price, D.H. Byrne (1996) A new procedure to prepare slides of Metaphase Chromosomes of roses. Hort Sci. 31:855-857
- Matthew, D., J. Mottley, I. Horan, & A. V. Roberts (1991) A protoplast to plant system in roses. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 24: 173-180
- Meyer, P., I. Heidemann, G. Forkmann, and H. Saedler (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene . Nature 330: 677-678
- Mottley, J., K. Yokoya., D. Matthews, J. Squirrell and J. E. Wentworth (1996) Protoplast fusion and its potential role in the genetic improvement of roses. Acta Hort. 424: 393-397
- Murashige, T., F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murray, M. G., W. F. Thompson (1980.) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- Napoli, C., C. Lemieux, R. Jorgensen (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279-289
- Noriega, C., & M. R. Söndahl (1991) Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. Bio/technology 9: 991-993

- O'farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021
- 大川 清 (1999) バラの生産技術と流通 養賢社
- Poovaiah, B. W. (1974) Formation of callose and lignin during leaf abscission. Am. J. Bot. 61: 829-834.
- Rashid, H., K. Toriyama, K. Hinata (1996a) Transformed plant production from leaf disc of *Moricandia arvensis* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 15: 799-803.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, and K. Hinata (1996b) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. Plant Cell Rep. 15: 727-730.
- Robinson, K., (1994.) Regeneration of transformed rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. Bio/technology 12: 613-613.
- Rout, G. R., B. K. Debata, & P. Das (1991) Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landola. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 27: 65-69
- Ruzin, S. E. (1999) Plant Micro Technique and Microscopy. Oxford University Press, New York
- 最相 葉月 (2001) 青いバラ 小学館
- Sambrook, J., F. F. Frisch, T. Mariatis (1989) Molecular cloning 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Souq, F., P. Coutos-Thevenot, H. Yean, G. Delbard, Y. Maziere, J. P. Barbe, et M. Boulay (1996) Genetic transformation of roses, 2 examples: one on morphogenesis, the other on anthocyanin biosynthetic pathway. Acta Hort. 424: 381-388
- 鈴木 省三 (1990) LA ROSE (ばら・図譜) 小学館
- Tabaezadeh, Z. and M. Khosh-khui (1981) Anther culture of rose. Scientia Horticulturae 15: 63-66
- 多良和誠, 宮岸 真, 川崎宏明, 明石英雄 (2003) RNAi 実験プロトコール 羊土社
- Torres, A. M. (1993) Identifying rose cultivars using random amplified

- polymorphic DNA markers. HortScience 28: 333-334
- Toyoda, H., K. Yoshida, Y. Ogata, Y. Morikawa, K. Koreeda, K. Chatani and S. Ouchi (1993) Establishment of a system for efficient callus induction and plant regeneration from leaf explants of axillary bud-cultured rose plants. Plant Cell Engineering 10: 293-297
- Trick, H. N., J. J. Finer (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Trans. Res. 6: 329-336
- Trick, H. N., J. J. Finer (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Rep. 17: 482-488.
- Tsuchiya, T., K. Toriyama, M. Yoshikawa, S. Ejiri, K. Hinata, (1995) Tapetum-specific expression of the gene for an endo- β -1,3-glucanase causes male sterility in transformed tobacco. Plant Cell Physiol. 36:487-494.
- van der Salm, T. P. M., C. J. G. van der Toorn, C. H. Hänisch ten Cate, and H. J. M. Dons (1996) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. Plant Cell Rep. 15: 522-526
- Visessuwan, R., T. Kawai, and M. Mii (1997) Plant regeneration from cell suspension culture driven from immature embryo of rose. Plant Biotechnol. 14: 29-33
- 安田 斉 (1993) 花色の生理・生化学 (増補版) 内田老鶴園
- Yokoya, K., S. Walker and V. Sarasan (1996) Regeneration of rose plants from cell and tissue cultures. Acta Hort. 424: 333-337
- Yosida, K., T. Kondo, Y. Okazaki and K. Katou (1995) Cause of blue petal colour. Nature 373: 291